État de l'art en matière d'analyse des cyanobactéries et des cyanotoxines

Rapport déposé au

Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT)

Programme de recherche en partenariat sur les cyanobactéries

Revues de littérature sur des sujets spécifiques

Dossier : 2014-CY-178273

RAPPORT FINAL

Rapport de recherche R-1475

Lucie Coudert, Delphine Rolland, Jean-François Blais, Isabelle Laurion et Guy Mercier

Institut national de la recherche scientifique

Centre Eau Terre et Environnement

490, rue de la Couronne, Québec, QC, Canada, G1K 9A9

1er Février 2014

ISBN : 978-2-89146-804-6

Rédaction :

Lucie Coudert (Volets Réglementation & Détection et quantification des cyanotoxines),
Delphine Rolland (Volets Échantillonnage & Détection et quantification des cyanobactéries).

Supervision :

Jean-François Blais INRS-ETE, Isabelle Laurion INRS-ETE, Guy Mercier INRS-ETE.

Révision :

Christian Bastien CEAEQ, Sylvie Blais CEAEQ, Pierre Chevalier ISPQ, Christian Deblois CEAEQ, Yvon Fréchette MDEIE, Luc Levert CEAEQ, Marc Sinotte CEAEQ.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

AchE	Acétylcholinestérase
AEP	Alimentation en eau potable
AFSSA	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AFSSET	Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et des transports
AGLAE	Association générale des laboratoires d'analyse de l'environnement
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
APPEL	Approche par élimination
AQ	Assurance qualité
ARS	Agence régionale de santé
ATX-a	Anatoxine-a
AWCQ	Australian water quality centre
BEQUALM	Biological effects quality assurances in monitoring programs
BMAA	ß-N-méthylamino-L-alamine
CB	Cyanobactéries
CDOM	Matière organique dissoute colorée
CEAEQ	Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
CEN	Centre de normalisation
Chl-a	Chlorophylle-a
Chl-b	Chlorophylle-b
CHU	Centre hospitalier universitaire
CIAE	Centre d'ingénierie aquatique et écologique
CIRSEE	Centre international de recherche sur l'eau et l'environnement
CMA	Concentration maximale acceptable
CMF	Cytométrie en Flux
CNRS	Centre National de Recherche Scientifique
CRIT	Centre for research and innovation in toxicology
CSRICO	Commonwealth scientific and industrial research organisation
CT	Cyanotoxines
CYL	Cylindrospermopsine
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DCE	Directive cadre eau en Europe
DIN	Deutches institut für Normung
DJT	Dose journalière tolérable
DL	Dose létale
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EQAT	External quality assessment trials phytoplancton
FID	Détecteur à ionisation de flamme (Flame ionization detector)
FIV	Fluorescence *in vivo*

GC	Chromatographie en phase gazeuse (Gas chromatography)
GTX	Gonyautoxines
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (High performance liquid chromatography)
INRA	Institut national de la recherche agronomique
IOP	Propriété optique inhérente
LC	Chromatographie liquide (Liquid chromatography)
LD	Limite de détection
LPS	Lipopolysaccharide
MC-LR	Microcystine-LR
MCs	Microcystines
MERIS	Medium imaging resolution spectrometer
MODIS	Moderate resolution imaging spectroradiometer
MS	Spectrométrie de masse (Mass spectrometry)
NASA	National aeronautics and space administration
NATA	National association of testing authorities
NODs	Nodularines
NSW	New South Wales
OMS	Organisation mondiale de la santé
ONEMA	Office national de l'eau et des milieux aquatiques
PC	Phycocyanine
PE	Polyéthylène
PIR	Proche infrarouge
PP2A	Protéine phosphatase 2
PPIA	Test d'inhibition de la protéine phosphatase (Protein phosphatase inhibition assay)
PSP	Paralytic shellfish poisoning
PVC	Polychlorure de vinyle
REBECCA	Relationships between ecological and chemical status of surface waters
RFU	Ratio fluorescence unit
Rpm	Rotation par minute
SPE	Solid-phase extraction
SPM	Particule en suspension
STX	Saxitoxines
TFA	Acide trifluoroacétique
UMR	Unité Mixte de Recherche
UNESCO	Organisation des Nations Unies pour l'Éducation, la Science et la Culture
UPC	Universitat politècnica de Catalunya
USA	United States of America
USEPA	United states environmental protection agency
UV	Ultra-violet
WHO	World health organization
WISER	Water bodies in Europe: Integrative Systems to assess Ecological status and Recovery

1 Introduction

1.1 Cyanobactéries

Une des principales causes de détérioration de la qualité de l'eau des lacs et réservoirs d'eau douce est le phénomène d'eutrophisation, c'est-à-dire, une augmentation excessive des apports externes de nutriments, qui a pour conséquence la prolifération de fortes biomasses de microalgues, de périphyton, de macrophytes et de bactéries photosynthétiques, telles que les cyanobactéries (Istvánovics 2009; O'Sullivan 1995). Ce phénomène s'est amplifié depuis les dernières décennies, y compris au Québec, où par exemple en 2012, 139 plans d'eau étaient touchés par des efflorescences de cyanobactéries (MDDEP 2012).

En effet, l'augmentation des activités anthropiques favorisant l'apport en quantité importante de nutriments vers les écosystèmes aquatiques (épandage, rejet d'eaux usées, déforestation) provoque une accélération de l'eutrophisation dans les zones du globe modérément à très densément peuplées. Par ailleurs, les cyanobactéries étant favorisées par une augmentation de la température de l'eau, de la stabilité de la colonne d'eau et de la durée de la saison de croissance (Vincent 2009); de nombreux experts s'accordent sur le fait que les changements climatiques ont le potentiel d'amplifier ce problème dans le futur (Dupuis et Hann 2009; Paerl et Huisman 2008).

1.1.1 Définition

Les cyanobactéries sont des eubactéries de type Gram négatif et autotrophes puisqu'elles sont capables d'utiliser le dioxyde de carbone (CO_2) comme source de carbone. À cet égard, les cyanobactéries sont similaires aux plantes supérieures, algues eucaryotes, bactéries photosynthétiques et bactéries chimiolithotrophes. Puisque ce sont les premiers organismes capables de photosynthèse oxygénique apparus sur la Terre (production de matière organique et d'oxygène à partir d'eau et de dioxyde de carbone), elles sont en grande partie à l'origine de l'augmentation de l'oxygène atmosphérique il y a deux milliards d'années (Van den Hoek et al. 1995). Conformément aux organismes procaryotes, les cyanobactéries sont dépourvues d'un noyau délimité par une membrane et d'organites, tels que les chloroplastes et les mitochondries. Par conséquent, les cyanobactéries, communément appelées « *algues bleues* » ou « *algues bleu-vert* », ne sont pas des algues à proprement parler et ce terme doit être évité si l'on souhaite demeurer scientifiquement rigoureux. Le terme « *cyano-* », dérivé du grec, découle de la présence de pigments majeurs appelés phycobiliprotéines (Grossman et al. 1995). Les

chromophores des phycobiliprotéines sont la phycocyanine (A_{max} 620 nm) et l'allophycocyanine (A_{max} 650 nm) qui confèrent un aspect bleuté aux cyanobactéries et la phycoérythrine, pigmentée rouge (A_{max} 560 nm) (Bryant 1991).

1.1.2 Conséquence de la prolifération des cyanobactéries

La prolifération des cyanobactéries engendre de lourdes conséquences sur la santé des écosystèmes, les risques sanitaires mais aussi sur la valeur économique des lacs et réservoirs touchés. La présence d'efflorescences de cyanobactéries affecte l'aspect esthétique d'un plan d'eau par l'augmentation de la turbidité, la couleur souvent verte ou turquoise des écumes et la production de molécules malodorantes, telles que la géosmine et le 2-méthylisoborneol (Izaguirre et al. 1982; Juttner et Watson 2007). Des concentrations importantes de cyanobactéries peuvent également causer une désoxygénation de la colonne d'eau dû à l'augmentation de la décomposition de la matière organique et, parfois, une mortalité massive de nombreux poissons et invertébrés ou une réduction de leur habitat, ainsi qu'une limitation de l'espace disponible pour les autres organismes photosynthétiques et une diminution de la biodiversité (Oliver et Ganf 2000; Paerl et al. 2001).

L'inquiétude demeure dans le domaine de la santé publique puisque certaines cyanobactéries synthétisent des cyanotoxines qui peuvent avoir des effets nocifs sur la santé animale et humaine suite à leur ingestion (Bownik 2010; Codd et al. 2005). Les trois principaux groupes de cyanotoxines sont définis selon leurs effets sur la santé humaine; c'est-à-dire les neurotoxines (anatoxines, saxitoxines, et β-N-methylamino-L-alanine), les hépatotoxines (microcystines, cylindrospermopsine, et nodularines) et les dermatotoxines (lyngbyatoxines, aplysiatoxines, et lipopolysaccharides). Les microcystines, ayant plus de 80 variantes différentes, sont les cyanotoxines les plus communes et sont synthétisées notamment par les genres *Microcystis*, *Anabaena, Anabaenopsis, Oscillatoria* et *Nostoc* (Carmichael et al. 2001; Huisman et al. 2005).

Tous les impacts mentionnés ci-dessus peuvent également avoir des conséquences économiques directes ou indirectes. En effet, les proliférations de cyanobactéries nocives peuvent augmenter considérablement les coûts de traitement de l'eau potable pour en éliminer la couleur, les odeurs et les toxines. Des proliférations excessives peuvent aussi obstruer les filtres et augmenter les coûts d'entretien des stations de traitement des eaux de consommation, sans compter la fermeture de plans d'eau (Dodds et al. 2008; Steffenson 2008). Une diminution des activités telles que la pêche, les activités

nautiques et la baignade aura également pour conséquence la dégradation de la valeur récréative de certains plans d'eau et des terrains résidentiels environnants.

1.2 Cyanotoxines

Les cyanotoxines sont des substances toxiques produites par de nombreuses espèces de cyanobactéries. À ce jour, environ 40 espèces de cyanobactéries productrices de cyanotoxines ont été répertoriées (Tableau 1.1). Ces substances toxiques sont classées en trois grandes catégories en fonction de leur organe cible: les ***hépatotoxines*** dont l'organe cible est le foie, les ***neurotoxines*** qui agissent sur le système nerveux et les ***dermatotoxines*** qui sont responsables d'allergies et d'irritations.

1.2.1 Neurotoxines

La cible principale des neurotoxines est le système neuromusculaire, provoquant des paralysies du système musculaire, notamment du système respiratoire, entraînant la mort des organismes touchés en l'espace de quelques minutes ou quelques heures (Sotton 2012). À ce jour, la présence de neurotoxines dans les eaux de baignade et récréatives a été enregistrée en Amérique du Nord, en Europe, ainsi qu'en Australie. Les neurotoxines sont groupées en trois familles:

- Anatoxines – alcaloïdes produits uniquement par les cyanobactéries;
- Saxitoxines;
- ß-N-méthylamino-L-alamine (BMAA).

Tableau 1.1 Liste non exhaustive des genres ou espèces producteurs de cyanotoxines (d'après BGAWB 2010; Chorus et Bartram 1999; Khlil 2011; USEPA 2012)

Catégorie	Toxines	Genres ou espèces producteurs
Neurotoxine	Anatoxine-a	*Anabaena flos-aquae; Anabeana spiroides; Anabaena circinalis; Aphanizomenon* sp.*; Cylindrospermum* sp.*; Oscillatoria* sp.*; Microcystis* sp.*; Phormidium* sp.*; Planktothrix* sp.*; Woronichinia* sp.
	Anatoxine-a(s)	*Anabaena flos-aquae; Anabaena lemmermanii*
	Homo-anatoxine	*Planktothrix* sp.
	Saxitoxine	*Aphanizomenon flos-aquae; Anabaena circinalis; Anabaena* sp.; *Aphanizomenon* sp.*; Cylindrospermum* sp.; *Lyngbya* sp.
	Néosaxitoxine	*Aphanizomenon flos-aquae; Anabaena circinalis*
Hépatotoxine	Nodularine	*Nodularia spumigena*
	Cylindrospermopsine	*Cylindrospermopsis raciborskii; Aphanizomenon ovalisporum; Umezakia natans; Raphidiopsis curvata; Anabaena* sp.
	Microcystine	*Microcystis aeruginosa; Anabaena millenii; Microcystis* sp.; *Planktothrix* sp.; *Oscillatoria* sp.; *Nostoc* sp.; *Anabaena* sp.; *Anabaenopsis* sp.; *Hapalosiphon* sp.
Dermatotoxine	Lyngbytoxine-a	*Lyngbya* sp.
	Debromaplysiatoxine	*Lyngbya* sp.; *Schizothrix calcicola, Oscillatoria nigroviridis*
	Aplysiatoxine	*Lyngbya* sp.; *Oscillatoria* sp.; *Planktothrix* sp.; *Schizothrix* sp.
	Lipipolysaccharides	Toutes

1.2.1.1 Anatoxines

Les anatoxines sont des alcaloïdes produits uniquement par les cyanobactéries, comprenant l'anatoxine-a et son homologue l'homo-anatoxine ainsi que l'anatoxine-a(S).

L'*anatoxine-a* (Figure 1.1a) est une amine secondaire bi-cyclique possédant un groupement cétone, de formule chimique $C_{10}H_{55}NO$, de masse moléculaire 165 Da (Afssa et Afsset 2006). L'*homo-anatoxine* (Figure 1.1b), un homologue de l'anatoxine-a, est un composé aminé bi-cyclique de formule chimique $C_{11}H_{57}NO$ et de masse moléculaire 179 Da. Ces molécules sont très solubles dans l'eau, cependant, elles sont peu stables et se décomposent rapidement dans le milieu naturel (temps de demi-vie: 1 à 2 h). La dose létale, DL_{50}, de l'anatoxine-a et de l'homo-anatoxine est comprise entre 200 et 250 $\mu g.kg^{-1}$ (Afssa et Afsset 2006; Chorus et Bartram 1999; Svrcek et Smith 2004).

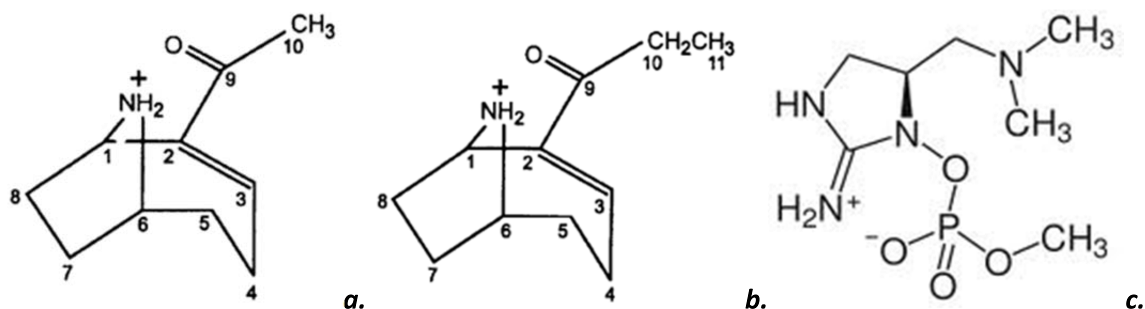


Figure 1.1 **Structure chimique de l'anatoxine-a (a.), de l'homo-anatoxine (b.) et de l'anatoxine-a(S) (c.) (d'après Sotton 2012)**

L'anatoxine-a(S) (Figure 1.1c) est un ester phosphate d'une N-hydroxyguanine de masse moléculaire 252 Da, dont aucune variante n'a été découverte à ce jour. Cette molécule se décompose rapidement en milieu basique, mais elle s'avère relativement stable dans des conditions neutres ou acides (Chorus et Bartram 1999). La DL_{50} de l'anatoxine-a(S) est de 20 $\mu g.kg^{-1}$ (Afssa et Afsset 2006).

1.2.1.2 Saxitoxines

Les saxitoxines, également connues sous le nom de Paralytic Shellfish Poisoning (PSP), sont des alcaloïdes possédant un noyau tétrahydropurique (Figure 1.2). Ces toxines peuvent être produites aussi bien par des cyanobactéries que par certaines espèces de dinoflagellés marins. Les saxitoxines sont responsables d'intoxications neurologiques après ingestion d'eau ou de fruits de mer contaminés connues sous le nom d'intoxications paralysantes par les fruits de mer. Les saxitoxines sont regroupées en trois familles:

- La saxitoxine et la néosaxitoxine (non sulfaté);
- Les gonyautoxines ou GTX (monosulfaté);
- Les C-toxines (doublement sulfatés).

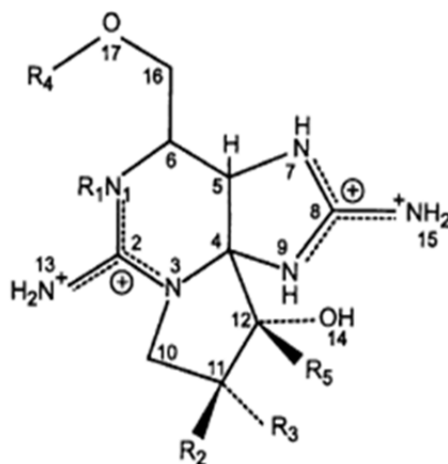


Figure 1.2 Structure chimique générale des saxitoxines (d'après Afssa et Afsset 2006)

De nos jours, vingt-cinq variantes de saxitoxines dont les masses moléculaires varient de 241 à 391 Da, ont été répertoriées à travers le monde. Selon des études réalisées en laboratoire, les saxitoxines sont des molécules très stables qui peuvent persister plusieurs mois dans la nature. La durée de demi-vie des saxitoxines en milieu naturel varie de 9 à 28 jours. Les GTX sont des molécules très persistantes dans l'environnement avec des temps de demi-vie pouvant aller jusqu'à trois mois (NHMRC 2004). La toxicité des saxitoxines est plus importante que celle des anatoxines, avec une DL_{50} estimée à 10 $\mu g.kg^{-1}$.

1.2.1.3 ß-N-méthylamino-L-alanine ou BMAA

La ß-N-méthylamino-L-alanine, ou BMAA, est un acide aminé non protéique, neurotoxique, de formule chimique $C_4H_{10}N_2O_2$ et de masse moléculaire 118 $g.mol^{-1}$ (Figure 1.3). Cette molécule organique relativement stable est produite par des cyanobactéries, dont certains *Nostocs* sp. Des recherches au niveau international sont en cours afin d'acquérir davantage de connaissances sur cette neurotoxine permettant d'en évaluer les sources et les niveaux acceptables pour la gestion des eaux récréatives ou de consommation (Sotton 2012).

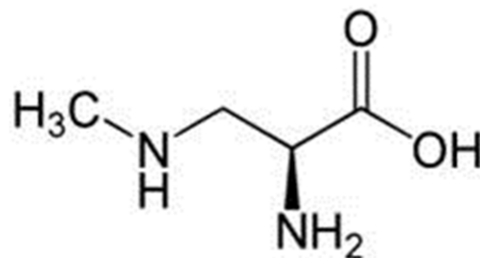


Figure 1.3 Structure chimique de la ß-N-méthylamino-L-alanine (d'après Sotton 2012)

1.2.2 Hépatotoxines

Lors de proliférations de cyanobactéries, les hépatotoxines sont les toxines les plus fréquemment rencontrées. L'organe cible des hépatotoxines est le foie, provoquant des lésions hépatiques par inactivation des protéines phosphatases (PP1, PP2A et PP3). Les hépatotoxines sont groupées en deux familles:

- Microcystines et nodularines;
- Cylindrospermopsine et ses analogues.

1.2.2.1 Microcystines et nodularines

Les microcystines (MCs) et les nodularines (NODs) sont des peptides cycliques hydrophobes composés de sept acides aminés et cinq acides aminés respectivement. La masse moléculaire de ces molécules varie de 800 à 1 100 Da. La formule chimique générale des MCs est cyclo-[D-alanine^{1}-X^{2}-D-MeAsp^{3}-Z^{4}-Adda^{5}-D-glutamate^{6}-Mdha^{7}] (Figure 1.4) et celle des NODs est cyclo-[D- MeAsp^{1}-L-arginine^{2}-Adda^{3}-D-glutamate^{4}-Mdhb^{5}] (Figure 1.5). De nos jours, plus de 80 variantes de microcystines et neufs variantes de nodularines ont été répertoriées à travers le monde. Les variantes des microcystines proviennent généralement de la substitution de deux acides aminés (X et Z). Les acides aminés les plus rencontrés pour les substitutions X et Y sont la leucine (L), l'arginine (R), la tyrosine (Y) et l'alanine (A). Parmi les variantes de MC existantes, la MC-LR est la plus répandue et la plus étudiée (Afssa et Afsset 2006; NHMRC 2004; Svrcek et Smith 2004).

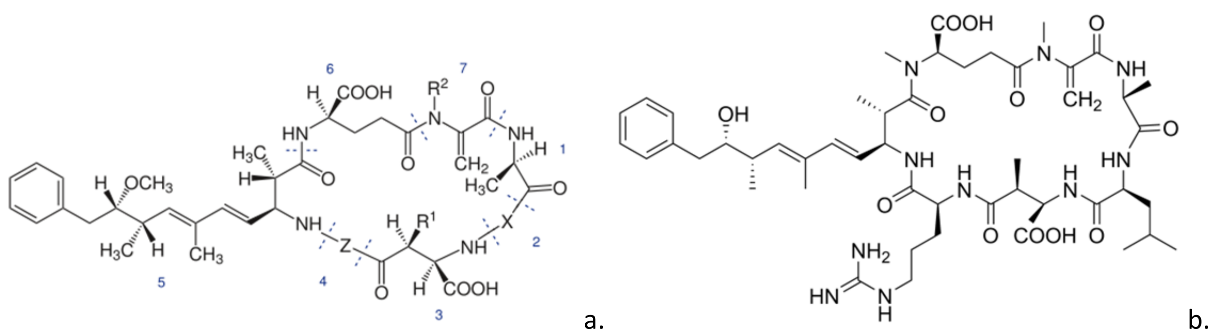


Figure 1.4 Structure chimique générale des microcystines (a) et de la microcystine-LR (b) (d'après Afssa et Afsset 2006; Svrcek et Smith 2004)

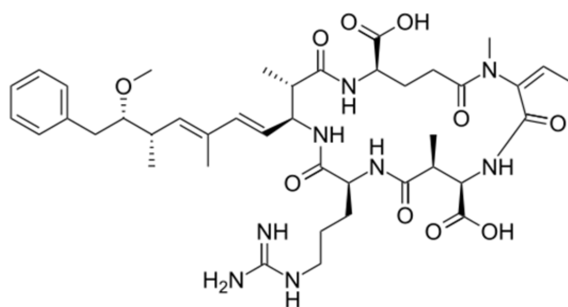


Figure 1.5 Structure chimique générale des nodularines (d'après Afssa et Afsset, 2006)

Les microcystines et les nodularines sont des molécules très solubles dans l'eau, et ce pour de larges gammes de pH et de température. Dans les eaux naturelles, les MCs peuvent persister dans les eaux naturelles de 2 à 6 semaines en présence de lumière, ou de plusieurs mois à plusieurs années en l'absence de lumière. La dose létale DL_{50} des microcystines varient entre 50 et 800 $\mu g.kg^{-1}$ (Chorus et Bartram 1999; Zurawell 2010).

1.2.2.2 Cylindrospermopsine et ses analogues

La cylindrospermopsine est un alcaloïde hydrophile cytotoxique, de masse moléculaire 415 Da. Cette hépatotoxine possède une structure chimique (Figure 1.6) différente de celle des microcystines et des nodularines. Elle est composée d'un groupement guanidine tricyclique associé à un groupement hydroxyméthyl-uracile. La cylindrospermopsine peut produire des effets néfastes sur le foie mais aussi sur les reins, le thymus et le cœur. À ce jour, deux variantes de la cylindrospermopsine ont été identifiées: 7-épicylindrospermopsine possédant une toxicité équivalente à la molécule mère (DL_{50} = 4,4 à 6,9 $mg.kg^{-1}$) et la 7-désoxycylindrospermopsine dont la toxicité est encore discutée (Antoine 2009; Sotton 2012). La cylindrospermopsine est une molécule peu photosensible et relativement stable qui se décompose très lentement dans l'eau à pH neutre, pour des températures allant de 4 à 50°C. La cylindrospermopsine ainsi que ces composés analogues peuvent persister dans les eaux pendant plusieurs jours voire plusieurs semaines. Contrairement aux autres cyanotoxines, de fortes concentrations en cylindrospermopsine ont été retrouvées sous forme soluble dans des eaux récréatives, alors que les efflorescences de cyanobactéries étaient encore en pleine expansion (Svreck et Smith 2004).

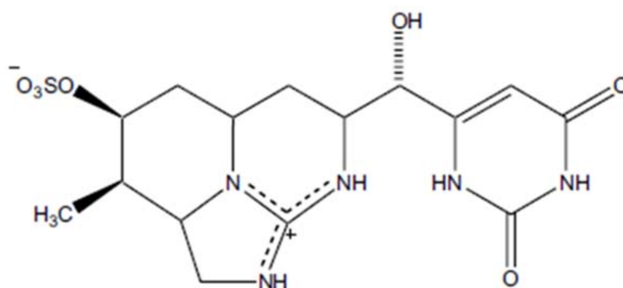


Figure 1.6

Structure chimique de la cylindrospermopsine (d'après Svreck et Smith 2004)

1.2.3 Cyanotoxines à effet irritants

Des molécules à effets irritants, appelées dermatotoxines, pouvant être sécrétées par des cyanobactéries, ont été retrouvées en milieu marin. À ce jour, il existe peu de connaissance sur les effets toxiques de ces molécules, ainsi que sur les méthodes permettant de les quantifier.

Parmi les dermatotoxines connues à ce jour, on retrouve:

- Les lipopolysaccharides;
- D'autres molécules moins connues: l'aplysiatoxine, la debromoaplysiatoxine, la lyngbyatoxine-a.

1.2.4 Lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des endotoxines qui constituent la paroi cellulaire des bactéries Gram négatif et, notamment, la paroi des cyanobactéries. Ces toxines sont des produits condensés de sucres, habituellement d'hexoses, et d'acides gras dont la formule chimique peut varier en fonction des espèces de cyanobactéries productrices. De manière générale, les lipopolysaccharides sont constitués d'un noyau polysaccharidique, d'une partie lipophile et d'une protéine antigénique de type antigène O (Afssa et Afsset 2006).

1.2.5 Molécules à effet irritant moins connues

Les molécules à effet irritant moins connues regroupent l'aplysiatoxine, la débromoaplysiatoxine et la lyngbyatoxine-a. Ces molécules, de nature alcaloïdique, sont responsables de fortes irritations cutanées et d'inflammations gastro-intestinales (Sotton 2012). Ces dermatotoxines s'avèrent problématiques dans les zones tropicales, notamment à Hawaï (Svreck et Smith 2004).

1.3 Objectifs

L'analyse des cyanobactéries et des cyanotoxines est un aspect fondamental de tout programme de gestion des plans d'eau touchés par des fleurs d'eau de cyanobactéries qu'il soit destiné aux activités récréatives ou au prélèvement d'eau pour la consommation. La distribution spatiale et temporelle des cyanobactéries dans la colonne d'eau étant soumise à de fortes variations, l'optimisation des protocoles de suivi est un enjeu très important. De nombreuses méthodes d'analyse des cyanobactéries et des cyanotoxines sont utilisées à travers le monde mais sont plus ou moins standardisées. La méthode d'analyse de cyanobactéries la plus commune est le dénombrement par microscopie, et les cyanotoxines sont le plus souvent détectées par des tests ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) et quantifiées par HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

L'objectif de ce rapport est de fournir une revue de littérature non exhaustive des méthodes analytiques de dénombrement des cyanobactéries et de dosage des cyanotoxines utilisées dans les laboratoires gouvernementaux, universitaires ou privés à travers le monde. Cette revue de littérature ne se limite pas aux méthodes analytiques utilisées par les laboratoires d'analyse lors de la gestion des épisodes de fleurs d'eau de cyanobactéries. L'inventaire de ces méthodes analytiques, ainsi que l'étude comparative de leurs avantages et inconvénients permettront *(i)* de proposer des orientations en vue de fournir une méthode standard répondant aux seuils décisionnels, et *(ii)* de faire un bilan des méthodes « d'*assurance contrôle* » de la qualité des analyses réalisées de façon routinière à travers le monde.

Cette revue de littérature portera sur trois aspects: *(i)* les techniques d'échantillonnage; *(ii)* les méthodes d'identification et de dénombrement des cyanobactéries, et *(iii)* les méthodes de détection, d'identification et de quantification des cyanotoxines, en mettant l'emphase sur les méthodes les plus couramment utilisées.

1.4 Méthodologie

Afin d'établir l'état de l'art des méthodes d'analyses des cyanobactéries et des cyanotoxines en utilisation dans les laboratoires à travers le monde, une consultation de guides et rapports (USEPA, USGS, NATA, ONEMA, UNESCO, etc.), de protocoles accrédités (Norme ISO/FDIS 20179, 2005, AFNOR NF EN 15204 – 2006), de revues de littérature scientifique (Chorus et Bartram 1999, Meriluoto et Codd 2005, Msagati et al. 2006, Sellner et al. 2003, etc.) ou autres publications scientifiques sur le domaine de l'analyse des cyanobactéries et des cyanotoxines a été réalisée. Plusieurs laboratoires à travers le monde ont également été contactés afin de répondre à un questionnaire (Annexe 1) permettant d'identifier les méthodes d'analyse des cyanobactéries et/ou des cyanotoxines ainsi que les modes de contrôle d'assurance qualité qu'ils utilisent. Le professeur *Triantafyllos Kaloudis*, responsable du projet CYANOCOST en Europe, a été contacté afin d'obtenir des informations sur les méthodes d'analyse des cyanobactéries et cyanotoxines, et il nous a proposé de transférer notre questionnaire aux 40 laboratoires et instituts participants au projet CYANOCOST. Les Annexes 2 et 3 présentent les laboratoires et personnes-références contactés dans le cadre de ce projet. Par souci de confidentialité envers les laboratoires privés, publiques et universitaires ayant répondu, le nom des laboratoires ont été remplacés par des codifications allant de 1 à 96.

2 État des lieux des règlementations et arbres décisionnels

Afin d'assurer une bonne gestion des eaux récréatives et de consommation et protéger la santé des usagers, plusieurs pays ont établi des valeurs guides ou des valeurs seuils associées à des actions correctrices ou des interdictions en se basant sur les lignes directrices définies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Les paramètres définis (comptage des cellules, détermination du biovolume ou concentration en cyanotoxines) ont pour but de refléter la concentration en biomasse cyanobactérienne présente dans l'eau brute et les risques potentiels pour la santé humaine. La section suivante présente les différentes valeurs guides ou seuils définies pour les eaux de consommation et pour les eaux récréatives à travers le monde.

2.1 Eaux de consommation

De nos jours, les données toxicologiques récoltées sont jugées insuffisantes pour établir des doses journalières tolérables (DJT) ou des valeurs guides pour les cyanotoxines autres que pour la microcystine-LR (facteur de toxicité équivalente à la MC-LR). La DJT définie par l'OMS est de 0,04 $\mu g.kg^{-1}.jr^{-1}$ pour la microcystine-LR. À partir de cette DJT, l'OMS a également établi de manière provisoire une concentration seuil en microcystine-LR acceptable dans l'eau potable en se basant sur l'Équation 2.1. Cette concentration seuil a été fixée à 1 $\mu g.L^{-1}$.

Équation 2.1 $$CMA = \frac{DJT \times \text{poids moyen} \times P}{V}$$

Où :

CMA représente la concentration moyenne acceptable ($\mu g.L^{-1}$);

DJT représente la dose journalière tolérable ($\mu g.kg^{-1}.jr^{-1}$);

Le poids moyen est celui d'un corps humain adulte (kg);

P représente la proportion de toxine absorbée lors de l'ingestion de l'eau (%);

V représente la consommation moyenne journalière d'eau potable pour un adulte ($L.jr^{-1}$).

Au niveau **international**, l'OMS a également défini des seuils d'alerte pour les eaux de consommation en considérant la quantité de biomasse cyanobactérienne présente dans l'eau (WHO 1998). Des actions à entreprendre par les gestionnaires des stations de potabilisation ont été associées à chaque seuil d'alerte:

- **Seuil de vigilance** (environ 200 cellules.mL^{-1}): Une augmentation de la fréquence d'échantillonnage à au moins une fois par semaine est conseillée afin de surveiller l'évolution de la biomasse cyanobactérienne;
- **Seuil 1 d'alerte** (2 000 cellules.mL^{-1}): La fréquence des surveillances doit être maintenue à au moins une fois par semaine. L'identification des genres et espèces de cyanobactéries présentes dans l'eau potable doit être réalisée pour évaluer s'il y a un risque de production de cyanotoxines. Les autorités sanitaires doivent être informées de la situation, une analyse des cyanotoxines peut être envisagée;
- **Seuil d'alerte 2** (100 000 cellules.mL^{-1}): un plan d'urgence doit être mis en place dans les plus brefs délais afin de garantir la distribution en eau potable aux consommateurs. Une surveillance des cyanobactéries doit être mise en place afin de déterminer le retour à une situation normale.

Au niveau National, plusieurs pays se sont servis de la valeur définie par l'OMS pour la DJT afin d'établir leur propre valeur seuil ou valeur guide en adaptant certains paramètres tels que le poids moyen d'un adulte ou la consommation journalière en eau potable. Les concentrations guides ou seuils définis par les différents pays sont globalement similaires, variant de 1,0 à 1,5 µg.L^{-1} MC-LR éq (Chorus 2012).

La demande pour l'établissement d'une concentration maximale acceptable pour la cylindrospermopsine devient de plus en plus importante en raison de la fréquente apparition de cette toxine et de son faible taux de biodégradation. Certains pays ont d'ailleurs défini des concentrations guides ou seuils pour d'autres cyanotoxines, telles que la cylindrospermopsine, l'anatoxine-a, l'anatoxine-a(S) ou encore les saxitoxines. Le Tableau 2.1 dresse une liste non exhaustive des concentrations guides ou seuils définis par ces pays. L'Annexe 4 présente un exemple d'arbre décisionnel établi par l'Afrique du Sud pour la gestion des eaux de consommation lorsque des efflorescences de cyanobactéries sont détectées.

Tableau 2.1 Liste non exhaustive des concentrations, valeurs ou seuils guides définis pour les eaux de consommation par différents pays à travers le monde. CB = cyanobactéries, CT = cyanotoxines

Pays	Cyanobactéries et/ou cyanotoxines réglementées	Valeur guide ou seuil	Commentaires ou action spécifique	Références
WHO	Cyanobactéries	Niveau de vigilance : > 200 cellules.mL^{-1}		WHO 1998
		Niveau d'alerte 1 : > 2 000 cellules.mL^{-1}		
	Microcystine-LR	Valeur guide provisoire : 1,0 µg.L^{-1} MC-LR		
Canada	Microcystine-LR	Valeur maximale: 1,5 µg.L^{-1} MC-LR éq		Guidelines for Canadian Drinking Water Quality
Argentine	Il n'existe pas de réglementation concernant les CB et les CT dans les eaux de consommation. Les lignes directrices sur la qualité de l'eau sont en révision et les autorités gouvernementales souhaitent ajouter les CB et les CT dans les paramètres à suivre.		La plupart des usines de potabilisation n'ont pas encore intégré l'analyse des CB ou des CT dans leur suivi. Certaines font un suivi selon les niveaux d'alerte suivants:	Chorus 2012
		≥ 500 cellules.mL^{-1}	Surveillance hebdomadaire	
		Niveau Alerte 1 : ≥ 5 000 cellules.mL^{-1}	Échantillonnage hebdomadaire et analyse CT bi-mensuelle	
		Niveau Alerte 2 : ≥ 10 000 cellules.mL^{-1}	Échantillonnage hebdomadaire et analyse des CB bi-mensuelle et information des autorités sanitaires et des consommateurs	
		Niveau Alerte 3 : ≥ 20 000 cellules.mL^{-1}	Analyse des CT trois fois par semaine et des CT hebdomadaire et information des autorités sanitaires et des consommateurs	
Australie	Cyanobactéries totales	> 500 celllules.mL^{-1}	Augmentation de la surveillance	NHMRC 2004
		> 2 000 celllules.mL^{-1}	Considération de la nécessité de réaliser des tests de toxicité (avis d'un expert)	
		> 6 500 celllules.mL^{-1}	Information des autorités sanitaires pour prise de décision	
	Microcystines	Valeur guide : 1,3 µg.L^{-1} MC-LR éq	Équivalent à 6 500 cellules mL^{-1} ou à un biovolume de 0,6 mm^3.L^{-1} de *Microcystis aeruginosa*	
	Nodularines	Aucune valeur	Niveau d'alerte santé : 40 000 cellules mL^{-1} ou un biovolume de 9,1 mm^3.L^{-1} de *Nodularia spumigea*	
	Cylindrospermopsines	Niveau d'alerte santé: 1,0 µg.L^{-1}	Équivalent à 15 000 - 20 000 cellules.mL^{-1} ou à un biovolume de 0,6 - 0,8 mm^3.L^{-1} de *Cylindrospermopsis raciborskii*	
	Saxitoxines	Niveau d'alerte santé: 3,0 µg.L^{-1}	Équivalent à 20 000 cellules.mL^{-1} ou à un biovolume de 5 mm^3.L^{-1} de *Anabaena circinalis*	

Pays	Cyanobactéries et/ou cyanotoxines réglementées	Valeur guide ou seuil	Commentaires ou action spécifique	Références
Brésil	Cyanobactéries totales	Valeur guide : 10 000 - 20 000 cellules.mL^{-1} ou biovolume de 1 mm^{3} L^{-1}	> 10 000 cellules.mL^{-1} requiert une surveillance hebdomadaire > 20 000 cellules.mL^{-1} requiert un test de toxicité et/ou la quantification des CT	Chorus 2012
	Microcystines	Standard: 1,0 µg.L^{-1} MCtot		
	Cylindorspermopsines	Guide valeur : 15 µg.L^{-1}		
	Saxitoxines	Guide valeur : 3 µg.L^{-1}		
Chine	Microcystines	Valeur guide provisoire : 1,0 µg.L^{-1}	-	Burch 2008
Corée	Microcystine-LR	Valeur guide provisoire: 1,0 µg.L^{-1} MC-LR	-	Burch 2008
Cuba	Cyanobactéries totales	< 1 500 cellules.mL^{-1}	Inspection visuelle mensuelle et échantillonnage au moins trimestrielle	Chorus 2012
	Phytoplanctons et cyanobactéries	20 000 - 100 000 cellules.mL^{-1}; 50% CB	Alerte: Augmentation des inspections (journalières) et des prélèvements (hebdomadaires) et information des autorités sanitaires et des gestionnaires locaux ainsi que du public	
	Cyanobactéries potentiellement toxiques Effet toxique observé sur les humains ou les animaux Présence d'efflorescence confirmée et persistante	Au moins une espèce - -	Augmentation des inspections (journalières) et des prélèvements (hebdomadaires) et informations des autorités sanitaires et des gestionnaires locaux ainsi que du public ainsi que mise en place de restriction d'eau	
Espagne	Microcystines (somme des variantes)	Standard: 1,0 µg.L^{-1}	Analyse requise lorsque le phénomène d'eutrophisation devient évident dans les eaux brutes	Chorus 2012
France	Microcystines (somme des variantes)	Standard: 1,0 µg.L^{-1} MCtot	Observation visuelle et analyse des CB dans les eaux brutes et au point de distribution lorsque les CB prolifèrent	Chorus 2012
Finlande	Cyanobactéries potentiellement toxiques dans les eaux brutes	> 5 000 cellules.mL^{-1} ou > 1 mg.L^{-1}	Surveillance des microcystines et durcissement du traitement	Chorus 2012
		> 100 000 cellules.mL^{-1} ou > 20 mg.L^{-1}	Mise en place de restriction d'utilisation de l'eau et informations aux consommateurs particulièrement si des microcystines sont trouvées dans l'eau après traitement	
	Microcystines (somme des variantes) - eaux brutes	Valeur guide provisoire: > 1,0 µg.L^{-1} MCtot	Mise en place de restriction d'utilisation de l'eau et informations aux consommateurs particulièrement si des microcystines sont trouvées dans l'eau après traitement	
	Microcystines (somme des variantes) - eaux potables	Valeur guide: > 10 µg/L MCtot	Interdiction de l'utilisation de l'eau potable	
Hongrie	Cyanobactéries	-	Fréquence d'échantillonnage basée sur la quantité d'eau potable produite et sur la source en eau, prélèvement d'un échantillon au moins une fois par an	Chorus 2012
Italie	Microcystines	Valeur guide provisoire: 0,84 µg.L^{-1}	-	Burch 2008

Pays	Cyanobactéries et/ou cyanotoxines réglementées	Valeur guide ou seuil	Commentaires ou action spécifique	Références
Japon	Microcystine-LR	Valeur guide provisoire : 1,0 µg.L^{-1} MC-LR	-	Burch 2008
Norvège	Microcystine-LR	Valeur guide: 1,0 µg.L^{-1} MC-LR	-	Burch 2008
Nouvelle-Zélande	Microcystine (MC-LR équivalent)	Valeur maximale provisoire: 1,0 µg.L^{-1} MC-LR éq	-	Chorus 2012
	Cylindrospermopsines	Valeur maximale provisoire: 1,0 µg.L^{-1}	-	
	Saxitoxines (STX équivalent)	Valeur maximale provisoire: 3,0 µg.L^{-1}	-	
	Anatoxine-a	Valeur maximale provisoire: 6,0 µg.L^{-1}	-	
	Anatoxine-a(S)	Valeur maximale provisoire: 1,0 µg.L^{-1}	-	
	Homoanatoxine-a	Valeur maximale provisoire: 2,0 µg.L^{-1}	-	
	Nodularines	Valeur maximale provisoire: 1,0 µg.L^{-1}	-	
Pologne	Microcystine-LR	Standard: 1,0 µg.L^{-1} MC-LR	-	Burch 2008
République Tchèque	Cyanobactéries totales	≥ 1 colonie.mL^{-1} ou ≥ 5 filaments.mL^{-1}	Niveau de vigilance: surveillance hebdomadaire (au minimum) des CB dans les eaux brutes et observation visuelle	Chorus 2012
		≥ 2 000 celllules.mL^{-1} ou ≥ 0,2 $mm^3.L^{-1}$ ou ≥ 1 µg.L^{-1} de Chl-a	Niveau d'alerte 1: Assurance que le traitement de la station de potabilisation est efficace pour réduire les CB et CT	
		≥ 100 000 celllules.mL^{-1} ou ≥ 10 $mm^3.L^{-1}$ ou ≥ 10 µg.L^{-1} de Chl-a	Niveau d'alerte 2: Assurance plus poussée que le traitement de la station de potabilisation est efficace pour réduire les CB et CT	
	Microcystine-LR	Standard: 1,0 µg.L^{-1} MC-LR	Surveillance hebdomadaire	
Singapoure	Microcystine-LR	Standard: 1,0 µg.L^{-1} MC-LR	Chaque fournisseur de réseau d'eau potable est légalement tenu de préparer et mettre en œuvre un plan de sécurité de l'eau pour s'assurer que le réseau d'eau potable est conforme aux normes de l'eau potable	Chorus 2012
Turquie (prévue pour 2014)	Cyanobactéries	> 5 000 celllules.mL^{-1} ou > 1 mg.L^{-1} Chl-a	Analyse hebdomadaire des eaux brutes. En cas de dépassement des valeurs guides, une analyse des CT est réalisée chaque semaine	Chorus 2012
	Microcystines (somme des variantes)	1,0 µg.L^{-1} MC-LR éq	Analyse des CT dans les eaux brutes et traitement par ozonation ou charbon actif	
Uruguay	Microcystine-LR	Standard: 1,0 µg.L^{-1} MC-LR	Les eaux de consommation ne doivent pas contenir des concentrations en CB qui pourraient affecter les caractéristiques de l'eau ou la santé humaine	Chorus 2012

Au Danemark, il n’existe pas de règlementation concernant les concentrations seuils en cyanotoxines dans les eaux de consommation étant donné que la majorité des eaux de consommation proviennent de nappes phréatiques. Dans le cas spécifique où des eaux de surface servent à alimenter un fournisseur en eau potable, seulement 10% des eaux de surface sont ajoutées à l’eau provenant des nappes phréatiques afin de s’assurer de respecter les lignes directrices de l’OMS (< 1 $\mu g.L^{-1}$).

En Allemagne, il n’existe pas de règlementation concernant les valeurs guides ou maximales en cyanotoxines dans les eaux de consommation puisque que seulement 20% des eaux de consommation proviennent d’eaux de surface et que la plupart des eaux de consommation sont issues de réservoirs protégés. Cependant, lorsque des cyanobactéries sont présentes dans les eaux de consommation, la valeur guide définie par l’OMS peut être appliquée pour les microcystines. Selon les directives Nationales concernant les substances ne possédant pas de preuve complète de toxicité telle que la cylindrospermopsine, ces dernières ne doivent pas être exclues et les directives proposent de limiter leur concentration à 0,1 $\mu g.L^{-1}$.

En Italie, un décret National inclut les « *algues* » comme paramètre à suivre par les autorités locales lorsqu’un risque est présumé en se basant sur les valeurs guides définies par l’OMS pour les microcystines.

Aux Pays-Bas, il n’existe pas de règlementation spécifique pour les cyanotoxines présentes dans les eaux de consommation, bien que 40% de ces eaux proviennent d’eaux de surface ou de bassins d’infiltration. Cependant, les concentrations en micro-organismes ne doivent pas excéder des niveaux pouvant avoir des effets néfastes sur la santé publique.

2.2 Eaux de baignade et de loisirs nautiques

Pour les eaux de baignade et de loisirs nautiques, certains pays ont mis en place des valeurs guides ou seuils et des niveaux d’alerte associés aux actions à entreprendre afin d’assurer une gestion sécuritaire et appropriée de ces plans d’eau.

Au niveau **international**, l’OMS a défini des seuils d’alerte pour les eaux récréatives (eaux de baignade ou eaux associées à des activités nautiques) en considérant la biomasse cyanobactérienne ou la concentration en Chl-a (WHO 1998). Les actions à entreprendre par les gestionnaires des sites récréatifs sont associées à chaque seuil d’alerte:

- **Probabilité faible d'effet(s) sur la santé** (environ 20 000 cellules.mL^{-1} ou 10 µg.L^{-1} de Chl-a): publication d'avis sur les risques de présence de cyanobactéries sur les aires touchées et informations aux autorités responsables de la situation;
- **Probabilité modérée d'effet(s) sur la santé** (100 000 cellules.mL^{-1} ou 50 µg.L^{-1} de Chl-a): surveillance des écumes ou des conditions menant à la formation d'écumes, limitation des activités de baignade, publication d'avis sur les risques de présence de cyanobactéries sur les aires touchées et informations aux autorités responsables de la situation;
- **Probabilité élevée d'effet(s) sur la santé** (formation d'écumes dans les aires où un contact cutané ou une ingestion/aspiration est possible): mise en place immédiate d'action pour limiter tout contact avec les écumes (interdiction possible de la baignade ou de toute autre activité nautique), suivi de la santé de la population et informations au public et aux autorités responsables de la situation.

Au niveau National, plusieurs pays se sont servis des valeurs guides définies par l'OMS afin d'établir leurs propres valeurs seuils ou guides, ainsi que les actions à entreprendre afin de protéger la population de tout risque lié à la présence de cyanobactéries et/ou de cyanotoxines. Le Tableau 2.2 dresse une liste non exhaustive des concentrations guides ou seuils définies par différents pays à travers le monde. L'Annexe 5 présente des exemples d'arbres décisionnels établis par différents pays pour la gestion des eaux récréatives lorsque des efflorescences de cyanobactéries sont détectées.

Tableau 2.2 Liste non exhaustive des concentrations, valeurs ou seuils guides définies pour les eaux récréatives par différents pays à travers le monde

Pays	Cyanobactéries et/ou cyanotoxines règlementées	Valeur guide ou seuil	Commentaires ou action spécifique	Références
WHO	Cellules ou Chl-a avec dominance de cyanobactéries	20 000 cellules.mL^{-1} ou 10 µg.L^{-1} de Chl-a	Information des utilisateurs du site et des autorités responsables	Chorus 2012
		100 000 cellules.mL^{-1} ou 50 µg.L^{-1} de Chl-a	Information des utilisateurs du site et des autorités responsables et surveillance des efflorescences	
	Efflorescence	Suivi des zones de baignade	Mise en place d'action pour empêcher le contact avec les efflorescences, possibilité d'interdiction de baignade ou autres activités nautiques	
Canada	Microcystine-LR ou comptage des cellules	≤ 20 µg.L^{-1} de MC-LR ou ≤ 100 000 cellules.mL^{-1}	Avertissement d'interdiction de baignade établi par les autorités responsables	Chorus 2012
Allemagne	Transparence en combinaison avec un indicateur de CB (Chl-a ou biovolume ou microcystines)	Disque de Secchi > 1 m et < 40 µg.L^{-1} de Chl-a ou < 1 mm^3.L^{-1} BV ou < 10 µg.L^{-1} MCtot	Surveillance du développement des CB	Chorus 2012
		Disque de Secchi > 1 m et < 40 µg.L^{-1} de Chl-a ou < 1 mm3/L BV ou < 10 µg.L^{-1} MCtot	Avertissement du public, considération de la fermeture temporaire de la zone et découragement de la population à se baigner	
	Ecumes et /ou microcystines	Observation d'écumes et/ou > 100 µg.L^{-1} MCtot	Avertissement du public, fermeture temporaire de la zone recommandée et découragement de la population à se baigner	
Argentine	Il n'existe pas de réglementation concernant les CB et les CT dans les eaux récréatives	-	-	Chorus 2012
Cuba	Cyanobactéries	< 500 cellules.mL^{-1}	Inspection visuelle mensuelle et échantillonnage au moins trimestrielle	Chorus 2012
	Phytoplancton; proportion de CB	20 000 - 100 000 cellules.mL^{-1}; > 50% CB	Alerte: Augmentation des inspections (journalières) et des prélèvements (hebdomadaires) et informations des autorités sanitaires et des gestionnaires locaux ainsi que du public	
	Cyanobactéries potentiellement toxiques	Au moins une des espèces		
	Effet toxique observé sur les humains ou les animaux	-	Action: Augmentation des inspections (journalières) et des prélèvements (hebdomadaires) et informations des autorités sanitaires et des gestionnaires locaux ainsi que du public ainsi que mise en place de restriction d'eau	
	Présence d'écumes confirmée et persistante	-		

Pays	Cyanobactéries et/ou cyanotoxines réglementées	Valeur guide ou seuil	Commentaires ou action spécifique	Références
Danemark	Inspection visuelle	Présence d'écumes dans les zones de baignade	Les autorités responsables sont informées et décident de où et comment le public doit être informé	Chorus 2012
	Cyanobactéries; Chl-a	> 50 µg.L^{-1} de Chl-a et CB dominante		
	Teneur en toxines		Quelques régions réalisent des analyses de toxines et incluent les résultats dans leur suivi des risques	
Finlande	Inspection visuelle	Aucune algue présente en surface; transparence de l'eau non affectée par les algues	Niveau 0: Non détecté	Chorus 2012
		Flocons verdâtres détectés dans l'eau ou lorsque l'eau est prélevée; la profondeur de Secchi est réduite par la présence d'algues	Niveau 1: Détecté - Examen au microscope et analyse des toxines possibles s'il y a un risque potentiel pour la santé publique ou pour les animaux	
		L'eau est colorée par les algues; petites surfaces avec efflorescences ou biomasse de CB détectées	Niveau 2: grandes quantités - Examen au microscope et analyse des toxines préférable et mise en garde du public	
		Larges efflorescences de CB détectées sur la rive	Niveau 3: très grandes quantités - Examen au microscope et analyse des toxines préférable, et mise en garde du public	
France	Inspection visuelle	Mousse ou écume visible ou changement de la coloration de l'eau	Examen au microscope. Si présence de CB, comptage et identification des espèces. Si absence de CB, aucune action supplémentaire	Chorus 2012
	Cyanobactéries	< 20 000 cellules.mL^{-1} ± 20%	Suivi actif quotidien et comptage des CB hebdomadaire - Activité nautique normale sur site	
		20 000 - 100 0000 cellules.mL^{-1} ± 20%	Suivi actif quotidien et comptage des CB hebdomadaire - Activité nautique autorisée mais avertissement du public	
	Cyanobactéries; Microcystines	> 100 000 cellules.mL^{-1} ± 10%	Si MC < 25 µg.L^{-1}, activités nautiques et baignade restreintes	
		25 µg.L^{-1} MC-LR éq ± 5%	Si MC > 25 µg.L^{-1}, activités nautiques restreintes et baignade interdite	
	Écume ou mousse	Apparition d'écume ou de mousse dans les eaux de baignade	Interdiction de baignade et d'activités nautiques dans la zone touchée	

Pays	Cyanobactéries et/ou cyanotoxines réglementées	Valeur guide ou seuil	Commentaires ou action spécifique	Références
Hongrie	Chl-a avec dominance de CB ou MCtot	< 10 µg.L^{-1} ou < 20 000 cellules.mL^{-1} ou < 4 µg.L^{-1} MCtot	Excellent	Chorus 2012
		< 25 µg.L^{-1} ou < 50 000 cellules.mL^{-1} ou <10 µg.L^{-1} MCtot	Bon	
		< 50 µg.L^{-1} ou <100 000 cellules.mL^{-1} ou < 20 µg.L^{-1} MCtot	Acceptable	
		> 50 µg.L^{-1} ou > 100 000 cellules.mL^{-1} ou > 20 µg.L^{-1} MCtot	Inacceptable	
Italie	Cyanobactéries	< 20 000 cellules.mL^{-1}	Si possible, observation visuelle journalière du site et dénombrement hebdomadaire	Chorus 2012
		20 000 - 100 000 cellules.mL^{-1}	Observation visuelle journalière du site et dénombrement hebdomadaire au minimum, quantification des microcystines et information au public	
	Écumes	Présence d'écumes dans les zones de baignade	Interdiction de baignade jusqu'à la quantification des microcystines, dénombrement hebdomadaire au minimum et information au public	
	Microcytines	> 25 µg.L^{-1} MCtot	Interdiction de baignade	
Pays-Bas	Intensité d'écumes de surface ou biovolume ou Chl-a attribuable aux CB	Écumes de catégorie 1 ou Chl-a < 12,5 µg.L^{-1} ou biovolume < 2,5 $mm^3.L^{-1}$	Niveau de surveillance: surveillance des zones aux quinze jours	Chorus 2012
		Écumes de catégorie 2 ou Chl-a entre 12,5 et 75 µg.L^{-1} ou biovolume entre 2,5 et 15 $mm^3.L^{-1}$	Alerte Niveau 1: Surveillance hebdomadaire et avertissement sur le site "*Toxic blue-green algae - Risk of skin irritation and intestinal problems*". Dans le cas d'une surveillance hebdomadaire, révision de l'avertissement chaque jour	
		Écumes de catégorie 3 ou Chl-a > 75 µg.L^{-1} ou biovolume > 15 $mm^3.L^{-1}$. Si les producteurs de microcystines dominent de 80% et MC < 20 µg.L^{-1}, retour au Niveau 1	Alerte Niveau 2: Surveillance hebdomadaire et avertissement contre la baignade "*You are advised not to bath in this water*", interdiction de baignade par les autorités locales si possible	
République Tchéque	Cyanobactéries et/ou Chl-a	> 20 000 cellules.mL^{-1}	1er niveau d'alerte	Chorus
		> 100 000 cellules.mL^{-1}	2ème niveau d'alerte: fermeture de la zone au public	2012

Pays	Cyanobactéries et/ou cyanotoxines réglementées	Valeur guide ou seuil	Commentaires ou action spécifique	Références
Turquie	Cyanobactéries ou microcystine-LR ou Chl-a	< 20 000 cellules.mL^{-1} ou < 10 µg.L^{-1} MC-LR éq ou < 10 µg/L de Chl-a	Niveau 1: Information du public de la situation à l'aide de panneaux sur le site. Surveillance bi-mensuelle (échantillonnage, identification et dénombrement)	Chorus 2012
	Cyanobactéries ou microcystine-LR	20 000 - 100 000 cellules.mL^{-1} ou > 25 µg.L^{-1} MC-LR éq	Niveau 2: Si > 20 000 cellules/mL, analyse des microcystines. Si > 25 µg/L MC-LR éq, action immédiate pour informer les autorités responsables et le public, découragement des utilisateurs à la baignade et autres activités nautiques	
	Écumes	Inspection visuelle	Niveau 3: Interdiction de baignade et de toutes autres activités nautiques	
Australie	Cyanobactéries	500 ≤ x < 5 000 cellules.mL^{-1} de *Microcystis aeruginosa* ou biovolume 0,04 < x < 0,4 $mm^3.L^{-1}$ de CB	Niveau de surveillance **Vert** : Surveillance régulière des eaux récréatives	Guidelines for Managing Risks in Recreational Water
		5 000 ≤ x < 50 000 cellules.mL^{-1} de *Microcystis aeruginosa* ou 0,4 < x < 4 $mm^3.L^{-1}$ de CB si dominance d'une CB productrice de toxines, ou 0,4 < x < 10 $mm^3.L^{-1}$ de CB si aucune CB productrice de toxine n'est présente	Niveau de surveillance **Jaune** : Augmentation de la fréquence des inspections visuelles et de l'échantillonnage, information des autorités et décision sur la nécessité de test de toxicité	
		≥ 50 000 cellules.mL^{-1} de *Microcystis aeruginosa* ou biovolume ≥ 4 $mm^3.L^{-1}$ de CB si dominance d'une CB productrice de toxines	Niveau de surveillance **Rouge 1** : Réalisation des tests de toxicité ou analyse des CT, information immédiate des autorités sanitaires	
		≥ 10 $mm^3.L^{-1}$ de CB si aucune CB productrice de toxines n'est présente	Niveau de surveillance **Rouge 2** : Réalisation des tests de toxicité ou analyse des CT, information immédiate des autorités sanitaires	
	Microcystines	≥ 10 µg.L^{-1}	Niveau de surveillance **Rouge 1**	
Nouvelle-Zélande	Cyanobactéries	< 500 cellules.mL^{-1}	Surveillance: Inspection visuelle hebdomadaire ou bi-mensuelle et échantillonnage du printemps à l'automne	Chorus 2012
	Biovolume	0,5 - 1,8 $mm^3.L^{-1}$ d'un biovolume pour des CB potentiellement toxiques ou 0,5 - 10 $mm^3.L^{-1}$ d'un biovolume total pour toutes les CB	Alerte: Augmentation des fréquences des inspections et de l'échantillonnage (hebdomadaire), avertissement du public	
	Microcystines ou Biovolume ou Ecumes	≥ 12 µg L^{-1} microcystines totales (MCtot) ou biovolume ≥ 1,8 $mm^3.L^{-1}$ pour des CB potentiellement toxiques ou biovolume ≥ 10 $mm^3.L^{-1}$ pour les CB totales ou présence constante d'écumes	Action: Augmentation des fréquences des inspections et de l'échantillonnage (hebdomadaire), quantification des microcystines si présence d'espèces toxiques, avertissement du public des risques potentiels pour la santé	

Aux États-Unis, il n'existe pas de règlementation Nationale sur les valeurs guides ou maximales en cyanobactéries et/ou les cyanotoxines dans les eaux récréatives. Cependant, chaque état a défini des valeurs guides ou seuils en cyanobactéries et/ou cyanotoxines ainsi que les niveaux d'alerte associés (surveillance, action, avertissement sanitaire, etc.). Le Tableau 2.3 dresse une liste non exhaustive des concentrations guides ou seuils définies pour les eaux récréatives par les différents états américains.

Tableau 2.3 Liste non exhaustive des concentrations, valeurs ou seuils guides définies pour les eaux de consommation et les eaux récréatives par les différents états des États-Unis (d'après Chorus 2012)

Région	Cyanobactéries et/ou cyanotoxines réglementées	Eaux de consommation	Eaux récréatives
Californie	Microcystines (MC-LA, MC-LR, MC-RR, MC-YR)		Niveau de surveillance : 40 – 10 000 cellules.mL^{-1} ou microcystines > 8 µg.L^{-1}
	Cylindrospermopsine		Niveau d'action : 4 µg.L^{-1}
	Anatoxine-a		Niveau de surveillance : > 70 000 cellules.mL^{-1}, > 14µg.L^{-1} Niveau d'action : 90 µ.L^{-1}
Floride	Microcystines	1 µg.L^{-1} MCtot pour une exposition chronique ou 10 µg.L^{-1} sur 90 jours	Aucune activité récréative autorisée dans les zones ayant des écumes
Indiana	Microcystines		Risque pour la santé faible : < 4 µg.L^{-1} MCtot Risque pour la santé faible à modérée : 4 - 20 µg.L^{-1} MCtot Risque pour la santé élevé - Nécessité de considérer une interdiction de contact avec l'eau : > 20 µg.L^{-1} MCtot
Iowa	Microcystines		Mise en place de surveillance de routine et avertissement/fermeture de la zone : > 20 µg.L^{-1} MCtot
Kansas	Cyanobactéries		Niveau d'avis sanitaire : > 20 000 cellules.mL^{-1} Niveau d'avertissement sanitaire : > 100 000 cellules.mL^{-1}
	Microcystines		Niveau d'avis sanitaire : > 4 µg.L^{-1} MCtot Niveau d'avertissement sanitaire : > 20 µg.L^{-1} MCtot
Maryland	Cyanobactéries ou microcystines		Mise en place de surveillance de routine : Cyanobactéries > 40 000 cellules.mL^{-1} ou microcystines > 14 µg.L^{-1} MCtot
Massachusetts	Cyanobactéries ou microcystines		Niveau de surveillance : > 70 000 cellules.mL^{-1}, > 8 µg.L^{-1}MCtot Niveau d'interdiction de contact avec l'eau : > 70 000 cellules.mL^{-1}, > 14 µg.L^{-1} MCtot
Michigan	-	-	Etude des cas et décision au cas par cas

Région	Cyanobactéries et/ou cyanotoxines réglementées	Eaux de consommation	Eaux récréatives
Nebraska	Microcystines		Mise en place de surveillance de routine et avertissement/fermeture de la zone : > 20 µg.L^{-1}
New Hampshire	Cyanobactéries		Mise en place de surveillance de routine : > 50% de cyanobactéries toxigéniques (toxigenic cyanobacteria)
New-York	-	-	Etude des cas et décision au cas par cas
Caroline du Nord	-	-	Surveillance de routine dans les zones à risques et surveillance normale dans les autres zones
Ohio	Microcystines	1 µg.L^{-1} MCtot	Niveau sanitaire : > 6 µg.L^{-1} MCtot Niveau d'interdiction de contact avec l'eau : > 20 µg.L^{-1} MCtot
Oklahoma	Cyanobactéries Microcystines		Niveau d'action : 100 000 cellules.mL^{-1} Niveau d'action : 20 µg.L^{-1}
Oregon	Cyanobactéries *Microcystis* ou *Planktothrix* Anatoxine-a Cylindrospermopsine Microcystines Saxitoxine	 3 µg.L^{-1} 1 µg.L^{-1} 1 -12 µg.L^{-1} MCtot 3 µg.L^{-1}	Niveau d'action : > 100 000 cellules.mL^{-1} Niveau d'action : > 40 000 cellules.mL^{-1} Niveau d'action : 20 µg.L^{-1} Niveau d'action : 6 µg.L^{-1} Niveau d'action : 8 µg.L^{-1} MCtot Niveau d'action : 100 µg.L^{-1}
Rhode Island	Cyanobactéries Microcystines		Niveau d'alerte sanitaire : > 70 000 cellules.mL^{-1} Niveau d'alerte sanitaire : > 14 µg.L^{-1} MCtot
Texas	Cyanobactéries		Niveau d'alerte sanitaire: > 20 000 cellules.mL^{-1} ou identification visuelle
Vermont	Microcystines		Niveau d'alerte sanitaire/fermeture : > 6 µg.L^{-1} MCtot
Virginie	Microcystines		Aucune ligne directrice
Washington	Microcystines Anatoxine-a		Niveau d'alerte: ATTENTION : < 6 µg.L^{-1} MCtot Niveau d'alerte: AVERTISSEMENT : > 6 µg.L^{-1} MCtot Niveau d'alerte: DANGER : > 6 µg.L^{-1} + forte toxicité Niveau d'alerte: ATTENTION : < 1 µg.L^{-1} Niveau d'alerte: AVERTISSEMENT : > 1 µg.L^{-1} Niveau d'alerte: DANGER : > 1 µg.L^{-1} + forte toxicité
Wisconsin	Cyanobactéries		Fermeture de la zone de baignade : > 100 000 cellules.mL^{-1}

3 Échantillonnage

Malheureusement, aucune norme standardisée d'échantillonnage du phytoplancton et des cyanobactéries en particulier n'existe à ce jour. En 2008, le Comité Européen de Normalisation (CEN) a pris la décision de créer deux nouveaux documents de standardisation; sur l'échantillonnage et sur le calcul de biovolume. Récemment, un accord de subvention a été signé entre le CEN et le Deutsches Institut für Normung (DIN) afin de développer ces standards. Ces documents devraient être disponibles à partir de 2015. En attendant, de nombreux guides ont été développés, notamment dans le cadre du projet WISER (*Water bodies in Europe : Integrative Systems to assess Ecological status and Recovery*) monté dans le cadre de la Directive Cadre Eau en Europe (DCE). Au Québec, un protocole d'observations et d'échantillonnage pour les plans d'eau dans le cas de gestion d'épisodes de fleurs d'eau de cyanobactéries a été mis en place (Dorion et al. 2013).

3.1 Coopération multisectorielle

L'OMS recommande une coopération « *multisectorielle* » en ce qui concerne le suivi des cyanobactéries (Codd et al. 1999). En effet, la planification des programmes de surveillance devrait généralement impliquer la coopération entre les différents secteurs de l'environnement et de la santé : agences et organisations gouvernementales, fournisseurs d'eau potable, autorités responsables du tourisme et de la gestion de l'eau, collectivités locales, gestionnaires de plages, associations de protection environnementale, laboratoires d'analyses (accrédités ou non), etc. En général, les organismes gouvernementaux préconisent une surveillance de routine. Par exemple, en France, les Agences Régionales de Santé (ARS) s'occupent du suivi et de la communication des résultats mais délèguent l'échantillonnage et l'analyse à des laboratoires privés ou publics (Brient et al. 2004). C'est le cas aussi en Floride (St-Johns River Water Managment District; Casamatta 2006).

3.2 Période et fréquence de l'échantillonnage

La fréquence et la période de surveillance et d'échantillonnage doivent être adaptées aux situations locales. D'après l'OMS (Utkilen et al. 1999), les éléments clés sont les suivants:

- Les réservoirs d'eau potable devraient être surveillés régulièrement tout au long de l'année dans le cas où la persistance des cyanobactéries ne peut être exclue. Cela s'applique particulièrement

aux réservoirs de climats chauds et tempérés occupés par des populations telles que *Planktothrix* sp.

- La surveillance des plans d'eau récréatifs dans les pays tropicaux devrait couvrir l'année entière, tandis qu'elle peut être faite pendant la saison de croissance végétale uniquement dans les zones tempérées (début d'été à mi-automne).
- La fréquence de surveillance et d'échantillonnage devrait être augmentée lors de développements de populations de cyanobactéries ou lorsque des efflorescences persistantes ont lieu.

3.2.1 Échantillonnage régulier

La plupart du temps, des plans d'eau ciblés sont visités de façon régulière durant la période de croissance végétale (mi-printemps à mi-automne). La fréquence d'échantillonnage se fait de façon journalière, hebdomadaire, bimensuelle (le plus souvent) ou mensuelle selon les cas. La fréquence choisie dépend de l'effectif du personnel mis à disposition pour l'échantillonnage, mais aussi des analyses qui s'en suivront. Suite à la détection d'efflorescences, la fréquence d'échantillonnage peut aussi être augmentée. Cette décision sera prise en fonction des seuils décisionnels en vigueur dans le pays considéré (cf. Chapitre 2). Une définition claire et précise de la « *saison de croissance végétale* » n'est pas possible à travers le monde car la durée et le début de la période libre de glace varie beaucoup selon les latitudes et longitudes. Cependant, il est évident que les périodes de juillet à août sont en général privilégiées pour les lacs Européens et Nord-Américains comme l'indique la Figure 3.1 (Mitschke et al. 2012).

Un tel suivi régulier est préconisé par la plupart des agences gouvernementales à travers le monde puisque cela permet de suivre l'évolution de la biomasse cyanobactérienne, qui peut être très rapide lorsque les conditions environnementales sont optimales (taux de croissance μ d'environ 0,4 jour^{-1} à 20°C et 0,7 jour^{-1} à 25°C; Lürling et al. 2013). Ces taux de croissance estimés peuvent être utilisés pour construire un ensemble de « *courbes de croissance* » théoriques pour une population de cyanobactéries à partir d'un nombre initial de cellules. Newcombe (2009) a fait ce calcul en considérant un taux de croissance lent ($\mu = 0,1$ h^{-1}) et un taux de croissance rapide ($\mu = 0,5$ h^{-1}) et ce, sans considérer les pertes (Tableau 3.1). Sur la base de cette évaluation, elle recommande ainsi que l'échantillonnage ait lieu au moins une fois par semaine et deux fois par semaine lorsqu'un nombre de cyanobactéries supérieur à 2 000 cellules.mL^{-1} est atteint.

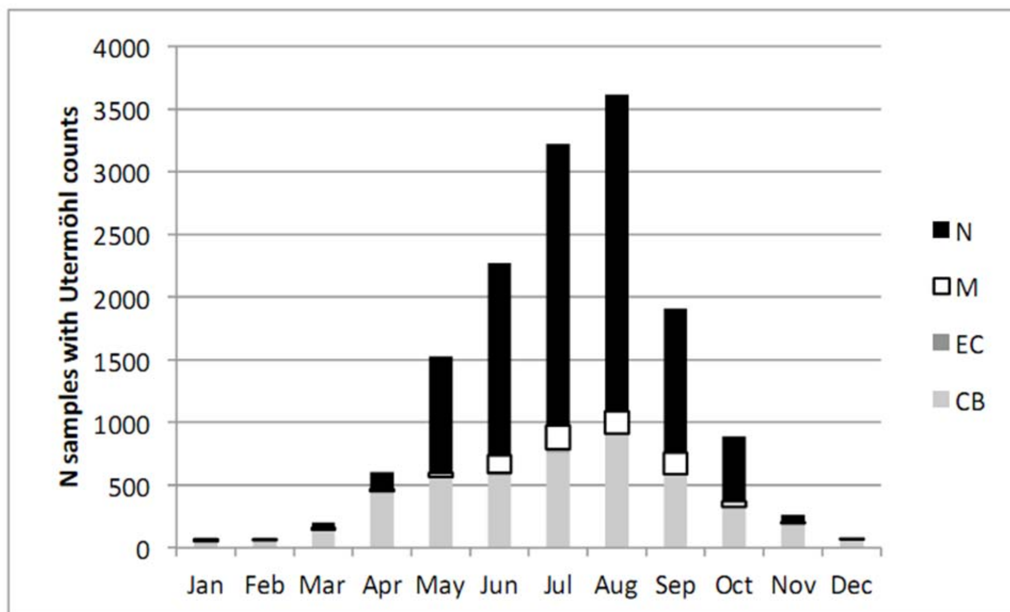


Figure 3.1 **Nombre d'échantillons analysés par mois pour déterminer la composition taxonomique du phytoplancton dans des lacs Européens faisant partie du projet WISER (Mischke et al. 2012).** ***N= région Nordique, M= région Méditerranéenne, EC= région Centre-Est, CB= région Baltique***

Tableau 3.1 **Abondance des cyanobactéries (cellules.mL^{-1}) qui peuvent être atteintes à partir d'une population croissante en appliquant deux facteurs de croissance distincts (d'après Newcombe 2009)**

Abondance initiale des cyanobactéries (cellules.mL^{-1})	**Temps de doublement de la population (jour)**	**Abondance finale des cyanobactéries (cellules.mL^{-1})**			
		3 jours	**7 jours**	**14 jours**	**28 jours**
100	6,93 (lent)	-	200	400	1 500
100	1,73 (rapide)	-	800	6 400	> 500 000
1000	6,93 (lent)	-	2 000	4 000	> 15 000
1000	1,73 (rapide)	3 500	16 000	> 250 000	> 2 000 000

3.2.2 Échantillonnage après un signalement

Lorsque l'effectif du personnel est plus limité ou lorsque la charge des plans d'eau à surveiller est trop considérable, les instances responsables du suivi des efflorescences de cyanobactéries peuvent mandater des utilisateurs de la ressource en eau. Ceux-ci peuvent être des exploitants de plages, des associations de protection environnementale, ou encore, des citoyens résidant aux alentours du plan d'eau. Dans ce cas, des guides d'identification permettent aux utilisateurs de déterminer s'il y a un risque probable pour les usagers et s'il y a nécessité de signaler l'évènement (par ex. Vermont Environmental Health 2008). Des indicateurs visuels tels que la transparence de l'eau, la couleur de l'eau ou la formation d'écumes serviront d'éléments déclencheurs. L'avantage de cette méthode est que cela responsabilise les citoyens qui deviennent ainsi acteurs de la gestion et de la protection des écosystèmes aquatiques. Un autre avantage est que la surveillance d'indicateurs visuels de cyanobactéries, concentrée sur des sites critiques, ne requiert aucun équipement. De plus, la formation du personnel, des exploitants et des résidents est facile à faire et leur expérience sur le long terme entraine une amélioration de leur performance. Cette approche nécessite beaucoup de temps sur le terrain, mais qui peut être grandement diminué en impliquant tous les acteurs du bassin versant ciblé. Cependant, il est préférable que cette méthode soit utilisée en complément d'un suivi régulier de plans d'eau cibles, c'est-à-dire les réservoirs d'eau potable et les zones d'activités récréatives à forte fréquentation. De plus, l'équipe de surveillance devra effectuer des contrôles de qualité régulièrement. Plusieurs programmes de surveillance volontaire du phytoplancton marin ont incorporé l'utilisation de microscopes de terrain permettant de reconnaitre les espèces potentiellement proliférantes dans le but d'assister les gestionnaires dans la détection rapide d'efflorescences (Hall 1999). Cette approche pourrait être adaptée au cas des cyanobactéries en eau douce.

3.3 Distribution spatiale des stations d'échantillonnage

Du fait de la forte variabilité spatiale (horizontale et verticale) des cyanobactéries, il est nécessaire de choisir rapidement les points d'échantillonnages les plus stratégiques lorsque l'on se trouve dans un contexte de suivi de la qualité de l'eau. Les campagnes de surveillance de plans d'eau visent habituellement à déterminer l'abondance des cyanobactéries et les concentrations de cyanotoxines dans les zones d'exposition potentiellement plus importantes, telles que les zones de baignade et/ou de loisirs et d'activités nautiques dans le cas de plans d'eau récréatifs, et les zones sensibles telles que les

baies et les zones près des barrages (accumulation potentielle) et des stations de pompage dans le cas des sites de prélèvement d'eau potable.

3.3.1 Point fixe

Ici, la collecte des échantillons est toujours effectuée aux mêmes points, par exemple à l'exutoire, sur la plage, au centre du lac, etc. (Figure 3.2). L'avantage de cette méthode est que cela permet l'obtention de résultats qui seront comparables statistiquement. Cette méthode peut être utilisée lorsqu'il y a un objectif de recherche, comme par exemple pour une étude sur la variabilité temporelle de la communauté cyanobactérienne à l'échelle d'une saison. Cette méthode est aussi largement utilisée dans le cas des eaux récréatives où les activités se concentrent en une zone spécifique du lac (plage, zone de baignade). Cependant, cette méthode ne tient pas compte des variables environnementales qui agissent sur la distribution spatiale des cyanobactéries, en particulier le vent et les courants. Il y a donc toujours un risque non négligeable de sous-estimation de la biomasse des cyanobactéries.

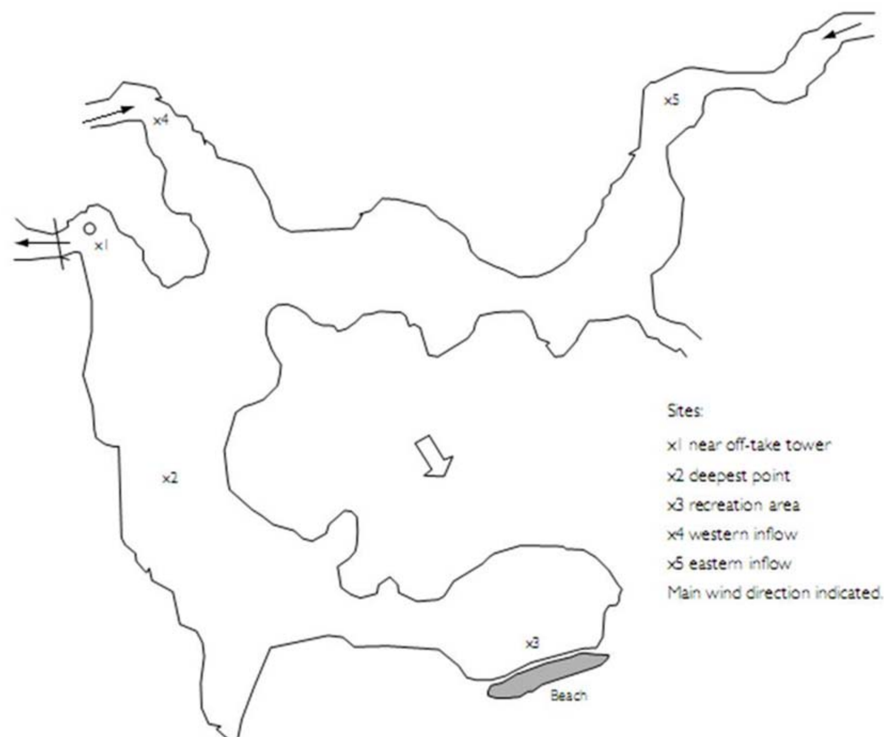


Figure 3.2 Suggestions de sites d'échantillonnage dans un large réservoir (d'après Hötzel et Croome 1999)

3.3.2 Point mobile

Ces points peuvent être déterminés en fonction de la situation météorologique. En effet, les vents dominants étant dirigés par exemple vers l'ouest, les rives et baies situées à l'ouest seront préférentiellement échantillonnées. Au contraire, lors de conditions de vent très calme, voire nul, un point au centre du lac, ainsi que plusieurs points en rive autour du lac devraient être échantillonnés. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite beaucoup de temps et la possibilité d'avoir accès à toutes les zones du lacs (embarcation et zone de mise à l'eau nécessaires).

3.3.3 Dans une efflorescence ou écume

Dans ce cas, après le signalement de la présence de fortes biomasses de cyanobactéries par un exploitant ou un citoyen, un technicien se déplace rapidement pour effectuer l'échantillonnage. Au contraire de l'échantillonnage en point fixe, qui ne prend pas en compte l'effet du vent, le prélèvement dans une écume formée par l'effet du vent et des vagues, va donc indirectement considérer les conditions météorologiques. De plus, les cyanotoxines étant généralement retrouvées en plus grande abondance dans les écumes, elles y présentent un risque majeur pour la santé des usagers. Cependant, l'absence d'écume ne traduit pas une absence de prolifération de cyanobactéries. Par exemple, certaines espèces filamenteuses telles que *Planktothrix agardhii* ou *Limnothrix redekei* ne forment pas de colonies flottantes mais peuvent tout de même proliférer et rester dispersées de façon homogène dans le métalimnion (Dokulil & Teubner 2000). Cela est particulièrement problématique lorsque la prise d'eau est située à cette profondeur.

3.4 Méthodes d'échantillonnage

Dans tous les cas, les contenants utilisés pour l'échantillonnage doivent être systématiquement rincés trois fois avant l'échantillonnage, même s'ils sont neufs.

3.4.1 Échantillonnage de surface

L’échantillonnage de surface (dans une écume ou non, en rive ou au centre) est réalisé avec une bouteille en plastique ou en verre à large col. La bouteille est remplie en décrivant un arc de cercle vers le bas, c'est-à-dire en entrant dans les premiers centimètres de la colonne d’eau, puis en remontant vers la surface (Dorion et al. 2013). Pour les écumes : il est nécessaire de déplacer le goulot de la bouteille le long de la surface pour recueillir les couches denses. En général, cette méthode est utilisée lorsque les moyens sont limités et l’échantillonnage est généralement fait depuis le rivage. L’inconvénient de cette méthode est qu’il y a un fort risque de contamination avec des cyanobactéries benthiques (telles que *Cylindrospermum majus* par exemple) et d’effets d’accumulation dus à la présence de la rive. Mischke et al. (2012) recommandent que cette méthode soit abandonnée au profit d’un échantillonnage intégré dans une zone de pleine eau.

3.4.2 Échantillonnage intégré

L’échantillonnage intégré, c'est-à-dire prenant en compte une couche d’eau d’une certaine profondeur, peut se faire à l’aide de bouteilles intégratrices (Pelletier et Orand 1978) ou de tubes préleveurs souples ou rigides (CEN 2006) de 1 à 5 m de long (Figure 3.5). La profondeur à intégrer peut être 1 m lorsque les usages récréatifs sont effectués en surface seulement, la colonne d’eau totale (dans le cas de plans d’eau peu profonds), la zone euphotique, c'est-à-dire recevant jusqu’à au moins 1% de la lumière incidente, ou l’épilimnion, c’est à dire la couche d’eau plus chaude située au dessus de la thermocline (Figure 3.3). Cette méthode a l’avantage d’être peu coûteuse, rapide et permet d'obtenir un échantillon d’un volume homogène et représentatif de la couche d’eau échantillonnée.

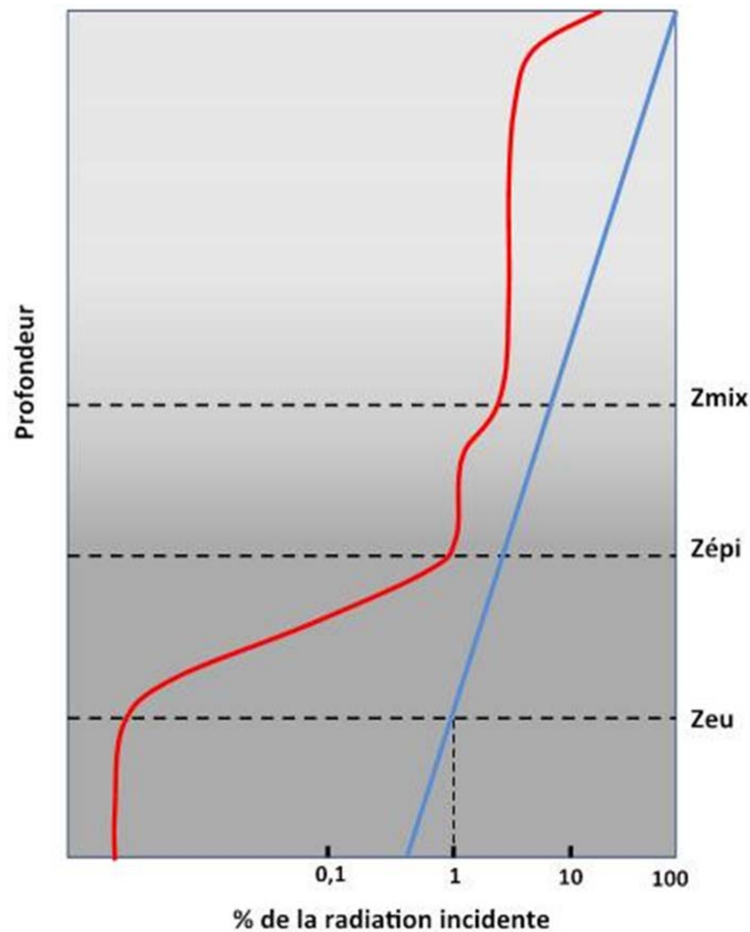


Figure 3.3 **Schéma de la répartition des strates physiques d'un lac, où Z_{mix} est le bas de la zone de mélange, $Z_{épi}$ le bas de l'épilimnion, et Z_{eu} le bas de la zone euphotique**

Laplace-Treyture et al. (2009) recommandent d'échantillonner la zone euphotique, définie dans cet article comme la tranche d'eau comprise entre la surface et 2,5 fois la profondeur de disparition du disque de Secchi. Lorsque la zone euphotique est supérieure à la profondeur totale de la colonne d'eau, le prélèvement intégré est réalisé de la surface jusqu'à 1 m au-dessus du fond. Dans la plupart des pays Européens, l'échantillonnage est effectué au site le plus profond du lac et dans la zone euphotique (Tableau 3.2). Cette stratégie est soutenue par les travaux de Nõges et al. (2010) qui ont montré que 2,5 fois la profondeur de Secchi est un critère approprié dans les lacs stratifiés. Cependant, les auteurs recommandent aussi d'échantillonner à 3 fois la profondeur de Secchi ou à la profondeur de l'épilimnion dans le cas de turbidité élevée, de manière à ne pas manquer le maximum profond de Chl-a (*Deep Chlorophyll Maximum*) (Figure 3.4).

Tableau 3.2 **Résultats d'une enquête sur les méthodes d'échantillonnage du phytoplancton utilisées en Europe dans le cadre du projet WISER (Birk et al. 2010).** ***n = nombre de laboratoires (total 22)***

Échantillonnage intégré	Strate échantillonnée	Fréquence d'échantillonnage durant la saison de croissance
Oui (*n* = 18)	Zone euphotique (*n* = 14)	> 4 échantillons (*n* = 6)
Non (*n* = 4)	Épilimnion (*n* = 3)	4 échantillons (*n* = 5)
	Profondeur de sub-surface (*n* = 4)	3 échantillons (*n* = 4)
	Depuis le rivage (*n* = 1)	2 échantillons (*n* = 4)
		1 échantillon (*n* = 3)

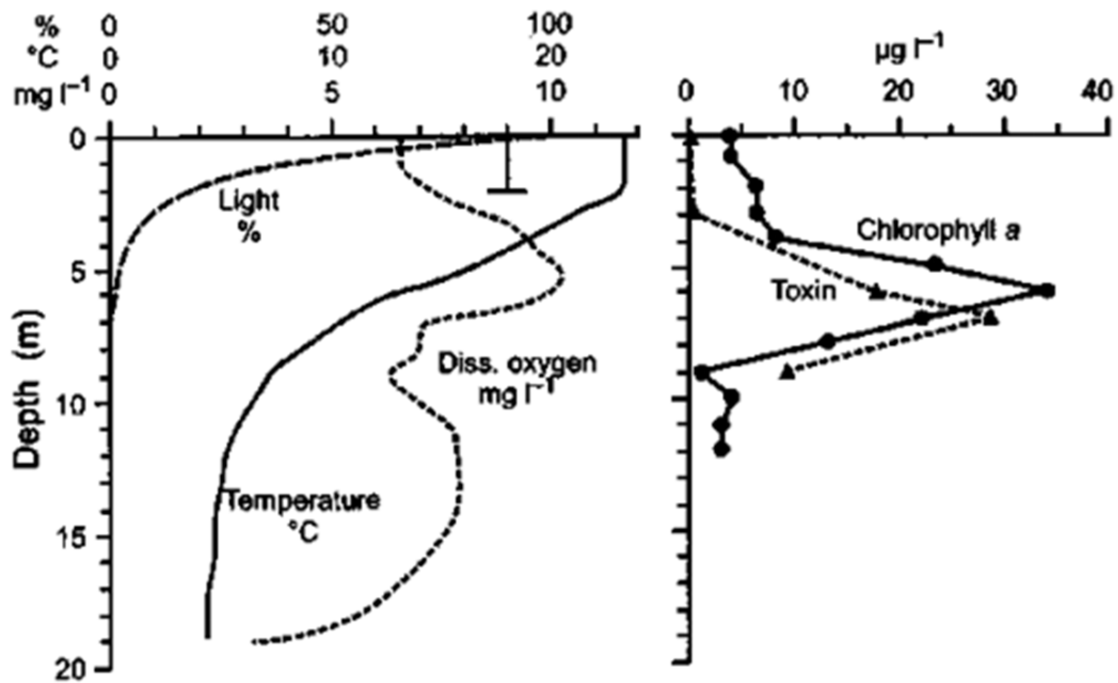


Figure 3.4 **Distribution verticale de la chlorophylle-*a* et de la microcystine-RR provenant de *Planktothrix agardhii* dans le lac Östra Kyrksundet en relation avec les conditions de lumière et de stratification thermique le 6 juillet 1988 (d'après Lindholm et Meriluoto 1991). Noter le maximum de chlorophylle-a et de toxine situées à la limite de la zone euphotique et non en surface ou sub-surface**

3.4.3 Échantillonnage discret et/ou composite

Une bouteille de type Van Dorn ou encore une pompe péristaltique (Figure 3.5) peut être employée. Dans ces deux cas, un volume donné (0,5 ou 1 L) est prélevé au minimum tous les mètres (ou tous les 0,5 m si la profondeur du plan d'eau est faible) pour ensuite être mélangé dans un plus grand récipient dans lequel le prélèvement de phytoplancton sera réalisé. Il est impératif de bien veiller à ne pas conserver le récipient sous une insolation ou une pluie directe pouvant modifier la qualité de l'échantillon, et à homogénéiser le contenu du récipient immédiatement avant le prélèvement du sous-échantillon. Cette méthode est une alternative à la méthode d'échantillonnage intégré. Cependant, elle prend plus de temps et le résultat sera plus incertain du fait d'une perturbation de la colonne d'eau potentiellement plus importante.

Outil de prélèvement	schéma	couche d'eau prospectée		volume d'eau échantillonnée	volume échantillon	Avantages	Inconvénients	Type de suivi
robinet usine (eau brute captage)		à Z_p		1 litre	0,5 - 1 litre	Facile et rapide pour le traiteur d'eau. Échantillon identique à ce qui rentre dans l'usine. Même point d'échantillonnage que pour le contrôle.	Algues parfois dégradées par le pompage, mais rarement les cyanobactéries. Une seule profondeur testée et pas en surface. Insuffisant si répartition des cyanobactéries hétérogène.	AEP
tube échantillonneur		Z = 0 - 1m		1 litre	0,5 - 1 litre	Assez facile si accès au bord ou barque. Bien représentatif du risque baignade. Adapté aux lacs peu profonds ou cours d'eau.	Peu représentatif si forte hétérogénéité verticale (surestime la concentration moyenne en cyanobactéries si écume, la sous-estime si bloom en profondeur).	baignade AEP (avec réserves) suivis écologiques (avec réserves)
bouteille de prélèvement		Zone euphotique (entre la surface et Z_{eu})		1 litre x nb de mètres de la Z_{eu}	0,5 - 1 litre	Bonne représentation de la couche de production algale. Matériel robuste. Adapté pour les lacs.	Coût de la bouteille élevé. Échantillonnage un peu plus long.	AEP suivis écolo-giques
pompe (péristaltique / électrique)		Zone euphotique (entre la surface et Z_{eu})		1 litre x nb de mètres de la Z_{eu}	0,5 - 1 litre	Précision de la profondeur d'échantillonnage. Accès aux blooms en profondeur.	Alimentation électrique. Entretien fréquent (recharge batterie, nettoyage de tuyaux…).	AEP suivis écolo-giques
filet à phytoplancton Ø ouverture ± 30cm Ø maille ± 25µm		Zone euphotique (entre la surface et Z_{eu})		quelques dizaines à quelques centaines de litres	± 50-200 ml	Bonne représentation qualitative de la zone de production algale.	Achat et entretien d'un filet. Volume d'eau échantillonnée imprécis. Échantillonnage sélectif (colmatage et refoulement), donc pas adapté pour analyses quantitatives	AEP baignade suivis écolo-giques

Figure 3.5 Différentes techniques d'échantillonnage (d'après Leitao et Couté 2005*). Zp = profondeur de la station de pompage, Zeu = profondeur de la zone euphotique, AEP = Alimentation en Eau Potable.*

3.5 Volume d'échantillonnage

Le volume d'eau à échantillonner dépend des types d'analyses réalisés. En ce qui concerne l'identification et le dénombrement des cyanobactéries, un volume de 100 à 200 mL est généralement suffisant (CEN 2006). En ce qui concerne l'identification et la quantification des cyanotoxines, le volume d'eau brute à prélever doit être compris entre 1 et 2 L si l'analyse est réalisée par HPLC après concentration des échantillons sur cartouche SPE (Solid Phase Extraction; Meriluoto et Codd 2005) et de quelques millilitres (50 – 100 mL) si l'analyse est réalisée à l'aide de méthodes immunologiques de type ELISA.

3.6 Précision de l'échantillonnage

Les variations spatiales et temporelles de la densité cellulaire dans la colonne d'eau peuvent engendrer de grandes différences entre plusieurs échantillons pris à quelques minutes d'écart ou à 100 m d'écart. Une détermination précise de la biomasse d'un échantillon une fois par semaine ne représente pas une base suffisante pour l'évaluation de la taille de la population cyanobactérienne d'un lac donné. D'après l'OMS, il serait préférable d'investir le même effort dans une évaluation moins précise d'un plus grand nombre d'échantillons (par ex. 10 échantillons pris dans des intervalles de 100 m, ou chaque jour; Utkilen et al. 1999).

3.7 Observations de terrain

Parallèlement à l'échantillonnage, des observations de terrain telles que les conditions climatiques, la profondeur du site échantillonné, les activités en cours sur le plan d'eau ou tout autre information qui pourrait être pertinente (présence de macrophytes, de poissons morts, de mauvaises odeurs, couleur de l'eau) pour comprendre l'apparition et la répartition des efflorescences est essentielle. Ces informations ne nécessitent pas de matériel en particulier donc peuvent être obtenues facilement. Un exemple de fiche de suivi est présenté à la Figure 3.6.

Il est en effet primordial que le gestionnaire connaisse les conditions écologiques et limnologiques du plan d'eau dont il a la charge afin d'anticiper sur le développement des programmes de surveillance. Il est rare que la composition générale du phytoplancton d'un plan d'eau change radicalement d'une année sur l'autre, et les évènements d'efflorescence sont généralement récurrents (Brient et al. 2004).

Par conséquent, des études de type « *diagnoses limnologiques* » peuvent être riches en informations et permettre d'ajuster les zones et dates à échantillonner dans le futur (par ex. APEL 2009). Dans ce genre d'études, les experts cherchent en général à connaitre les concentrations et flux entrants de nutriments (azote et phosphore), à suivre l'évolution des conditions de lumière, de stratification et de mélange, de saturation en oxygène et d'alcalinité. D'autres caractéristiques biologiques, telles que les variations spatio-temporelles de concentration en Chl-a, la composition des groupes phytoplanctoniques et du zooplancton, et les zones potentielles d'accumulations chroniques peuvent être déterminées. Cependant, dans certains cas tels que les réservoirs à écoulement rapide (court temps de résidence de l'eau), les variations interannuelles de la communauté cyanobactérienne peuvent être très importantes (par ex. le lac Saint-Charles, réservoir d'eau potable de la ville de Québec; Rolland et al. 2013). Dans ces cas, la mise en place d'un programme de surveillance devra être établie en s'appuyant sur un plus grand nombre d'années.

FICHE DE SUIVI QUOTIDIEN DES PLANS D'EAU (Baignade - Loisirs - Eau Potable)

SITE : **Mois :**

Date	Conditions météo					EAU									Fréquentation	Plaintes	Observations
	Température		Pluie	Vent	Météo	Transparence cm	Température de l'eau	Couleur	Écume en surface	Utilisation d'un algicide	Oxygène dissous		pH				
	10 H	16H									10 h	16 h	10 h	16 h			
1																	
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	
7																	
8																	
9																	
10																	
11																	
12																	
13																	
14																	
15																	

Figure 3.6 Fiche de suivi utilisée par les ARS en France lors de l'échantillonnage des zones de baignade (Brient et al. 2004)

3.8 Contrôle de qualité de l’échantillonnage

Une description détaillée des techniques de contrôle de la qualité de l’échantillonnage est donnée dans la norme ISO 5667-14 : 1998, et est résumée par Swanepoel et al. (2008). Les techniques de contrôle de qualité suivantes peuvent être envisagées.

3.8.1 Échantillonnage en réplicats

En prenant deux échantillons distincts (A1 et A2) au même point d'échantillonnage et en même temps, on obtient une estimation de la variance totale de l'échantillon (échantillonnage, conservation, stockage et analyse). En prenant un seul échantillon (B), puis en le divisant en deux sous-échantillons (B1 et B2), que l’on divisera encore en deux sous-échantillons (B11 et B12; B21 et B22), la différence entre B1 et B2 donnera une indication de la variance de l'analyse ainsi que de l'échantillonnage et du stockage. La différence entre les analyses de B11 et B12 et B21 et B22 donnera une estimation de la précision analytique.

3.8.2 Utilisation de blancs d’échantillonnage

- **Contrôle du transport:** De l’eau dé-ionisée préparée et préservée au laboratoire avant la campagne d’échantillonnage est emportée sur le terrain. Le contenant reste fermé pendant la durée du voyage. Ces blancs permettent de détecter une éventuelle contamination résultant du contenant ou de la méthode de préservation et de stockage.
- **Contrôle de terrain:** De l’eau dé-ionisée préparée et préservée au laboratoire avant la campagne d’échantillonnage est exposée à l’environnement d’échantillonnage, aux sites d’échantillonnages et manipulée de la même manière que les autres échantillons (préservation, concentration). Ces blancs fournissent une information quand à la contamination résultant de l’exposition à l’atmosphère et de la manipulation.
- **Contrôle de l’équipement:** Des échantillons d’eau dé-ionisée sont utilisés pour rincer les équipements. Ce type de blanc est utile pour déterminer l’efficacité du nettoyage et de la décontamination de l’équipement lorsque celle-ci est faite au site d’échantillonnage.

Lorsque les blancs fournissent des preuves de contamination, les échantillons réels sont susceptibles d'être biaisés vers une surestimation des densités de cyanobactéries ou de cyanotoxines. Dans certaines circonstances, un facteur de correction peut être appliqué sur les données, mais cela doit être signalé dans le rapport. Les règles de base pour évaluer la contamination sont: (1) pas plus de 5% des blancs ne devraient dépasser la limite de détection de la méthode et (2) les blancs ne doivent pas dépasser 10% des concentrations dans l'environnement.

3.9 Recommandations

Le Tableau 3.3 résume les plans d'échantillonnage recommandés selon les situations quant aux moyens à disposition et aux types de plan d'eau.

Tableau 3.3 Plans d'échantillonnage recommandés pour le suivi des cyanobactéries et des cyanotoxines

Type de plan d'eau	Moyens à disposition	Fréquence d'échantillonnage	Sites d'échantillonnage	Type d'échantillonnage
Activités récréatives en contact direct (baignade, plongée, activités nautiques) ou indirect (pêche, camping, marina)	Modérés à importants	En routine, pendant les périodes de pics de fréquentation: journalier, hebdomadaire ou bi-mensuel Fréquence de contrôle augmentée lorsque dépassement de seuils (20 000 ou 100 000 cellules mL^{-1})	Plusieurs points fixes : Zones d'accès du public (plages, quai, berges, etc.) Et Plusieurs zones de pleine eau (si le lac est grand) ou point le plus profond du lac	Échantillon de surface et/ou colonne d'eau intégrée dans zones peu profondes Zone euphotique intégrée dans secteurs de plus de 5 m, épilimnion si $Z_{eu} < Z_{épi}$
	Limités	Lorsque signalement	Dans la zone touchée par une efflorescence ou écume	Échantillon dans l'efflorescence et/ou l'écume
Réservoir d'eau potable	Modérés à importants	En routine, pendant la saison de croissance (début été à mi-automne): journalier, hebdomadaire ou bi-mensuel Fréquence de contrôle augmentée lorsque dépassement de seuils (5 000 cellules mL^{-1})	Plusieurs points fixes : Zones clés de la prise d'eau Plusieurs zones de pleine eau (si le lac est grand) ou point le plus profond du lac Et Zones potentielles d'accumulation (baies, proximité de barrage)	Échantillon de surface et/ou colonne d'eau intégrée dans secteurs peu profonds Zone euphotique intégrée dans secteurs de plus de 5 m, épilimnion si $Z_{eu} < Z_{épi}$
	Limités	Lorsque signalement	Dans la zone touchée par une efflorescence ou écume	Échantillon dans l'efflorescence et/ou l'écume

L’échantillonnage doit être effectué aussi selon les objectifs attendus. Par exemple, si l’objectif est de mettre en évidence les risques d’apparition d’efflorescence, un échantillonnage de profondeur intégrée est préférable. Si l’objectif est de déterminer le seuil de concentration atteint pour le comparer à la réglementation, un échantillon de surface est suffisant.

4 Détection et quantification des cyanobactéries

4.1 Introduction

Les protocoles opératoires d'identification et de dénombrement des cyanobactéries peuvent grandement varier selon les laboratoires. Cependant, la technique d'Utermöhl (1958) utilisant la microcopie inversée a été standardisée en Europe en 2006 (CEN 2006). Cette technique est donc plus couramment utilisée que les autres à travers le monde et demeure une référence. Nous traiterons donc plus amplement de cette technique dans cette partie, tout en proposant des alternatives. Il est primordial de ne pas négliger la conservation et le prétraitement des échantillons qui peuvent être une grande source d'erreur. Ces thématiques seront donc aussi traitées dans cette partie.

Les méthodes détaillées ci-dessous proviennent d'une compilation d'informations trouvées dans des articles scientifiques, documents standards généraux tels que celui du Comité Européen de Normalisation (CEN 2006), de l'Organisation des Nations Unies pour la Science, l'Education et la Culture (UNESCO; Karlson et al. 2010), de l'OMS (Chorus and Bartram 1999) de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE; Laplace-Treyture et al. 2009; Mischke et al. 2012) et nationaux parus en France (AFSSA et AFSSET 2006; Brient et al. 2004; Druart et Rimet 2008; Leitão et Couté 2005), Afrique du Sud (Swanepoel et al. 2008), Uruguay (Bonilla 2009), Australie (Hötzel et Croome 1999; Newcombe 2009), et États-Unis (Queensland Government 2008).

4.2 Conservation des échantillons

4.2.1 Contenants

Les échantillons peuvent être conservés dans des bouteilles en verre, polyéthylène (PE) ou chlorure de polyvinyle (PVC). Le PE souple présente cependant l'inconvénient d'absorber l'iode contenu dans le Lugol en laissant l'échantillon sans conservateur. De plus, les bouteilles de PE souples sont relativement difficiles à fermer hermétiquement. Les bactéries peuvent donc s'introduire dans l'échantillon par le filetage de la vis, ce qui conduit à la dégradation de l'échantillon lorsque les concentrations en conservateur sont trop faibles. Le verre et le PVC sont plus appropriés pour le stockage, mais ces deux matériaux présentent l'inconvénient d'être fragiles, et leur utilisation présente un risque pendant l'échantillonnage. En effet, il est habituel que les échantillons soient préservés directement sur le terrain en les stockant dans des bouteilles de verre. Il est donc recommandé d'effectuer la collecte des

échantillons avec des bouteilles en PE souple et de transférer ensuite l'échantillon dans des bouteilles en verre de retour au laboratoire (CEN 2006). De plus, il convient que le flacon de stockage soit transparent et non brun de manière à faciliter l'examen de l'état de conservation et de la présence d'agrégats.

4.2.2 Produits de conservation

La conservation ou préservation des échantillons se fait par fixation chimique. Cette opération a pour but de stabiliser les tissus pour permettre leur observation au microscope dans de bonnes conditions. Les conservateurs les plus fréquemment utilisés sont la solution de Lugol et le formaldéhyde. Dans certains cas, d'autres conservateurs peuvent être utilisés, tels que le glutaraldéhyde. En raison de sa forte toxicité et de l'utilisation peu fréquente de ce produit dans le cas de surveillance de routine des cyanobactéries, ce dernier conservateur ne sera pas considéré dans le présent document. La fixation chimique consiste à créer des chaînes insolubles par pontage des molécules organiques avec un agent chimique appelé fixateur. Ce dernier peut être un oxydant (Lugol, tétroxyde d'osmium) ou un aldéhyde (formaldéhyde, glutaraldéhyde). Les oxydants vont aussi jouer le rôle de contrastant, c'est-à-dire de colorant positif du matériel biologique. Cette technique permet de déshydrater les cellules sans détruire leur organisation générale du fait de la coagulation des protéines (Hayat 2000).

4.2.2.1 Lugol

La solution de Lugol est un mélange d'iode (I_2) et d'iodure de potassium (KI). Le Lugol s'oxyde dans l'air et à la lumière, par conséquent la solution doit être stockée à l'obscurité ou dans des bouteilles en verre brunes. Les concentrations finales de Lugol (10% iodure de potassium et 5% de cristaux d'iode) utilisées varient entre 0,5% et 1%. Cependant, le choix de la concentration utilisée doit dépendre de la densité de cellules dans l'échantillon: dans le cas des eaux oligotrophes, moins de 0,2% de Lugol peut déjà rendre difficile l'identification (*W.F. Vincent, comm pers*.). Parfois le mélange est fait à l'œil et le technicien se réfère à la couleur de la solution finale (jaune paille, cognac, whisky, thé; selon les protocoles). Cependant, cette couleur est aussi fonction des caractéristiques chimiques de l'eau échantillonnée (pH par exemple) et une concentration plus importante de Lugol sera donc parfois nécessaire pour l'atteindre. Les échantillons additionnés de Lugol peuvent être conservés à la température ambiante, mais à l'obscurité pour éviter la photo-oxydation s'ils sont analysés dans les 20 à 30 jours suivant leur prélèvement. Si les échantillons doivent être conservés sur une plus longue période avant d'être

analysés (au maximum 12 mois), ils doivent être réfrigérés entre 1 et 4°C et à l'obscurité. De plus, les bouteilles doivent être remplies à environ 80% pour que le jeu d'air favorise un brassage adéquat de l'échantillon avant l'analyse.

Les avantages du Lugol sont qu'il préserve bien les fines structures cellulaires du phytoplancton et qu'il pénètre rapidement dans les cellules. Cela permet une meilleure conservation des organismes sensibles au stress de l'échantillonnage, et facilite la sédimentation dans la chambre Utermöhl car il alourdit les cellules. Par contre, le Lugol colore les cellules (brun foncé), ce qui peut nuire à l'identification (mais il est alors possible d'éclaircir l'échantillon avant identification en réduisant l'iode à l'aide de thiosulfate de sodium), et il peut déformer ou même faire éclater les parois lorsque les concentrations sont trop importantes. L'inconvénient le plus important, en ce qui concerne les cyanobactéries, est un risque de désintégration de certaines colonies telles que formées par *Microcystis* sp. Une connaissance de la présence de colonies est utile.

La solution de Lugol peut être alcaline, acide ou neutre. Le Lugol alcalin est recommandé dans la méthode Utermöhl (Laplace-Treyture et al. 2009). Une déformation des membranes cellulaires de certains groupes d'algues et la perte de la structure des colonies sont fréquemment observées avec le Lugol acide. De plus, l'acide acétique est très volatile et irritant. La solution de Lugol alcalin (ajout d'acétate de sodium) donne de meilleurs résultats que le Lugol acide pour les échantillons d'eau douce. Cependant un avis contraire est émis par Mischke et al. (2012) qui recommandent du Lugol acide pour une meilleure sédimentation des cyanobactéries.

4.2.2.2 Formol (formaldéhyde)

L'utilisation de formaldéhyde (37% en fraction volumique) permet une conservation des tissus organiques et des structures cellulaires pendant de longues périodes de temps. Le formaldéhyde peut cependant se transformer lentement en acide formique et en MeOH (réaction de Cannizzaro; CEN 2006), ce qui affecte négativement la fixation et la conservation. Pour cette raison, la solution de formaldéhyde ne doit pas être conservée trop longtemps avant utilisation, et de préférence elle doit être tamponnée à pH 8-9. Un tampon approprié est l'hexaméthylène tétramine. L'utilisation du formol doit se faire à une concentration finale de 2% à 5% (CEN 2006).

L'avantage d'utiliser une solution de formaldéhyde est que la structure de la paroi cellulaire et d'autres caractéristiques morphologiques restent visibles. Lorsque les échantillons sont stockés correctement

dans des bouteilles appropriées, ils resteront en bon état pendant de nombreuses années. De plus, un avantage non négligeable comparé au Lugol est que l'auto-fluorescence de la Chl-a reste intacte pendant au moins plusieurs jours si les échantillons sont conservés à l'obscurité et au frais. Cependant le formaldéhyde est un irritant, même à de très faibles concentrations dans l'air, et peut entraîner des réactions allergiques. Il présente aussi l'inconvénient de décolorer les cellules avec le temps.

La solution de Lugol ne fixe pas la biomasse organique sur une longue durée, ce qui peut conduire à une dégradation des structures cellulaires internes. Pour éviter cela, le formaldéhyde peut être ajouté en plus du Lugol et aussi vite que possible, mais de préférence après le comptage.

4.2.3 Efficacité de l'agent fixateur

Les conservateurs sont toxiques par définition. En effet, ces produits conduisent à la mort des organismes mais induisent aussi une irritation chimique forte. Par conséquent, les organismes délicats sans parois cellulaires solides peuvent se dégrader avant que la fixation ne soit achevée. Pour minimiser cet effet, il est important que l'agent fixateur pénètre rapidement dans la cellule. Le taux d'entrée peut être amélioré par l'ajout de diméthylsulfoxyde (McCully et al. 1980).

4.2.4 Échantillons frais

Lorsque l'analyse peut se faire rapidement après l'échantillonnage (maximum 24 h à 48 h), l'échantillon peut être conservé entre 5 et 10°C à l'obscurité, sans ajout d'agent de conservation. Cela permet de conserver le matériel vivant tout en préservant la qualité des cellules (couleur, forme), et donc assure une identification plus facile. L'inconvénient est que l'analyse doit être effectuée très rapidement, idéalement dans les quelques heures qui suivent le retour du terrain. Cela nécessite une proximité du laboratoire, une organisation bien rodée du laboratoire, et une grande expertise des techniciens pour l'identification taxonomique afin que les analyses soient réalisées le plus rapidement possible.

4.2.5 Délais d'analyse

Dans une optique de surveillance des plans d'eau, il est recommandé d'effectuer les analyses dans un délai maximum de 48 h. De cette façon, des mesures de gestion des sources d'eau potable et des sites récréatifs pourront être prises rapidement (par ex. limitations de certaines activités, fermeture de plan

d’eau, choix d’une source d’eau potable alternative, ajustement du traitement de l’eau potable). Un délai plus long ne permettra pas de réagir au jour le jour, mais permettra au mieux de réaliser une banque de données qui pourra être utilisée pour étudier la dynamique des cyanobactéries dans un plan d’eau donné.

4.3 Homogénéisation

L’étape d’homogénéisation de l’échantillon avant toute procédure de concentration est primordiale. Pendant le stockage des échantillons, les particules en suspension se déposent et les (petites) cellules algales deviennent indiscernables par incorporation à des agrégats de détritus ou par adhésion à d'autres grandes cellules algales. La remise en suspension et la séparation des particules peuvent être obtenues en secouant vigoureusement l'échantillon. Ceci peut être effectué manuellement ou par l'utilisation d'un dispositif d'agitation approprié. Une agitation trop vigoureuse peut cependant conduire à la désintégration de colonies fragiles et à l'éclatement des cellules fragiles (par ex. phytoflagellés) sur les bulles d'air occasionnées.

4.4 Concentration

Une concentration des échantillons est nécessaire afin de faciliter l’observation au microscope et d’augmenter la robustesse et la précision du résultat. Cependant, cette concentration n’est pas nécessaire lorsque la densité des cyanobactéries est très importante (colonies visibles à l’œil nu, couleur verte intense). Un sous-échantillon brut ou dilué peut ainsi être directement utilisé.

4.4.1 Sédimentation

Le principe de la méthode repose sur la sédimentation de l’échantillon préalablement fixé. Pour cela, on utilise le Lugol qui, en plus de son rôle de fixateur-conservateur, favorise la sédimentation des cellules. Le temps de contact de l’échantillon avec le Lugol doit préférablement être d’au moins 24 h avant l’analyse pour favoriser une bonne sédimentation des cyanobactéries (Wetzel et Likens 2000). Les chambres de sédimentation qui consistent en des cylindres verticaux peuvent être de volume 1, 5, 10, 25, 50 et 100 mL (Figure 4.1).

Les premières chambres de sédimentation, développées par Lund (1951) et Utermöhl (1958), ont par la suite été modifiées pour permettre de séparer le cylindre vertical de la lame après la sédimentation des cellules. La lame de base, contenant les cellules sédimentées dans une petite dépression, est ensuite recouverte par une lamelle. Les cellules peuvent être observées en utilisant un microscope conventionnel aux plus faibles grossissements. Cependant, l'utilisation d'un microscope inversé est nécessaire pour l'utilisation des plus forts grossissements afin d'éviter la distorsion causée par la lamelle posée au-dessus de la chambre, plus épaisse que celle du dessous.

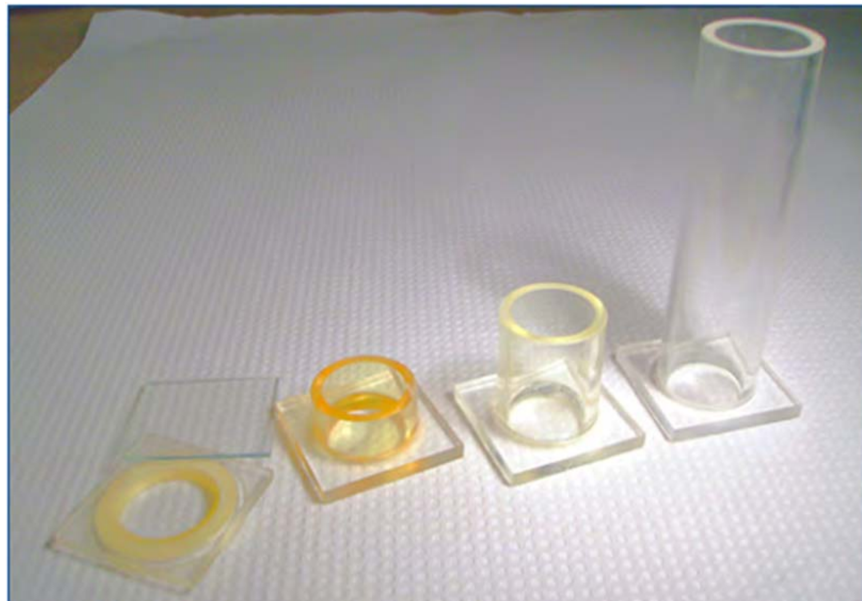


Figure 4.1 **Chambre de sédimentation et cylindres de type Utermöhl.** ***De gauche à droite; chambre de base avec lamelle de recouvrement, cylindre de 10 mL, cylindre de 25 mL, cylindre de 50 mL*** **(d'après Elder et Elbrächter 2010)**

Les chambres ainsi que les lames doivent être soigneusement nettoyées pour éviter toute contamination par des organismes provenant d'échantillons précédents. Le temps de sédimentation dépend du volume mis à sédimenter et doit être d'au moins trois fois la hauteur de la chambre de sédimentation en cm (Wetzel et Likens 2000).

Mischke et al. (2012) recommandent 12 h d'attente pour 10 mL, 24 h pour 25 mL et 48 h pour 50 mL. Les auteurs précisent également qu'un trop long temps d'attente (plusieurs jours) augmente le risque d'une perturbation de la répartition des cellules dans le fond de la chambre et le risque de formation de bulles. Un volume de 50 à 100 mL est requis pour les échantillons provenant d'eaux oligotrophes, tandis que 5 à 10 mL sont suffisants pour les eaux avec des densités élevées de phytoplancton (Wetzel et Likens 2000).

La chambre doit être remplie en une seule fois à la pipette ou directement avec la bouteille. Mischke et al. (2012) recommandent aussi de remplir un peu plus que nécessaire de manière à ce que cela déborde un peu lorsque l'on rajoute la lamelle par-dessus le cylindre, ce qui permettra ainsi d'éviter la présence de bulles et les fuites. Après sédimentation, on fait glisser le cylindre sur le côté tout en recouvrant la chambre de sédimentation avec une autre lamelle (Figure 4.2).

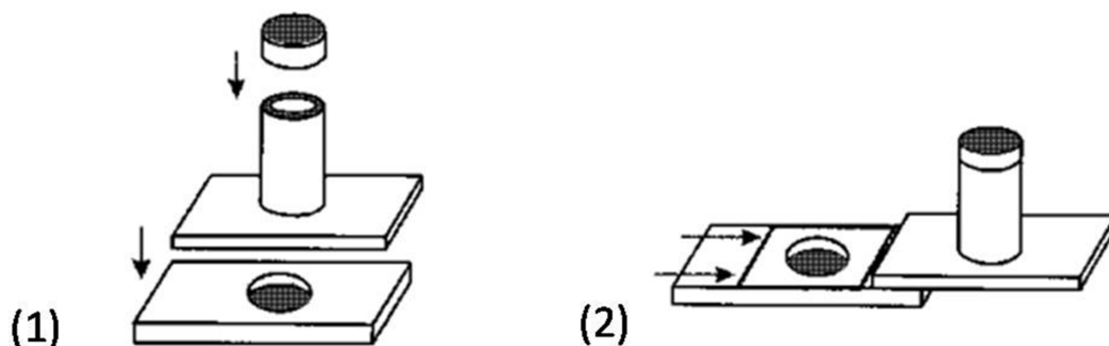


Figure 4.2 Étapes de la procédure de sédimentation avec chambres de comptage de type Utermöhl (d'après Lawton et al. 1999)

Cette méthode permet une bonne reproductibilité, une standardisation poussée et une préparation aisée des échantillons. Elle présente cependant l'inconvénient que certaines espèces de cyanobactéries peuvent difficilement sédimenter du fait de la présence de vacuoles de gaz. Si la microscopie inversée n'est pas possible et que des échantillons avec de faibles densités de cyanobactéries doivent être dénombrés, d'autres techniques de concentration par sédimentation peuvent être appliquées (par ex. la sédimentation dans un cylindre gradué, suivie par l'élimination du surnageant; Lawton et al. 1999).

4.4.2 Filtration

Cette méthode est utilisée dans le cas où l'on fait une identification et un dénombrement avec un microscope standard ou pour les cellules de petite taille qui sont souvent plus nombreuses. Un volume connu d'échantillon est passé sur filtre en polycarbonate d'une porosité de 0,45 µm, à l'aide d'un système de filtration et d'une pompe à vide (Communication personnelle avec Mr Luc Brient; Sawnepoel et al. 2008) ou encore d'une seringue pour les plus petits volumes à filtrer (Lawton et al. 1999). La filtration doit s'effectuer à une pression qui ne doit pas dépasser 1/10e atmosphère (Jacques 1978). La biomasse phytoplanctonique retenue sur le filtre est ensuite remise en suspension dans 1 mL d'eau ultra-pure et utilisée directement dans une cellule de comptage (Communication personnelle avec Mr Luc Brient) ou le filtre est directement placé sur une lame de microscopie en verre (Lawton et al. 1999). Dans ce dernier cas, il faut ensuite laisser le filtre sécher à la température de la pièce, ajouter une ou deux gouttes d'huile à immersion sur le filtre et recouvrir d'une lamelle. Cela va rendre le filtre transparent et permettre l'observation des cyanobactéries piégées à la surface. L'avantage de cette méthode est qu'elle est plus rapide à mettre en œuvre que la sédimentation. L'analyse peut donc être effectuée dès le retour du terrain. De plus, un microscope inversé n'est pas nécessaire et l'échantillon peut être observé frais, ce qui facilite l'identification des espèces. Cependant, il y a un risque de rupture des cellules sous l'effet de la pression, il est donc nécessaire d'être très vigilant lors de la filtration.

4.4.3 Centrifugation

La centrifugation permet de concentrer et conserver le matériel vivant, et peut être ainsi utilisée associée à la microscopie à épifluorescence. Jacques (1978) préconise l'utilisation d'un coagulant pour faciliter la précipitation et une vitesse de 1 000 à 1 500 $tr.min^{-1}$ pendant 20 min pour un échantillon de 10 à 50 mL. D'après Lawton et al. (1999), la centrifugation est une méthode rapide et pratique lorsque la

sédimentation n'est pas possible. Une fixation préalable au Lugol est alors nécessaire pour favoriser la séparation des cellules. Cependant, les cellules flottantes (celles possédant des vacuoles de gaz telles que *Microcystis* sp.) peuvent être difficiles à séparer et requièrent la désintégration préalable de leurs vacuoles avant la centrifugation, et ce en appliquant brusquement une forte pression hydrostatique (Walsby 1992).

4.4.4 Comparaison des méthodes

Comme pour l'échantillonnage, la technique de concentration utilisée va dépendre des objectifs de l'analyse et des moyens à disposition. Le Tableau 4.1 résume les avantages et inconvénients des trois principales méthodes de concentrations. Bien que la technique de sédimentation selon Utermöhl soit bien référencée et largement utilisée, la technique de reprise de l'échantillon après filtration sur membrane lisse peut être une solution avantageuse dans le cas particulier des cyanobactéries si l'on veut obtenir des résultats rapidement (moins de 48 h). Celle-ci est fortement recommandée par M. Luc Brient de l'UMR CNRS 6553 Ecobio (communication personnelle), spécialiste de la problématique des cyanobactéries et cyanotoxines en France.

Tableau 4.1 Caractéristiques des différentes techniques de concentration (d'après Sawnepoel et al. 2008)

	Sédimentation	Centrifugation	Filtration
Temps de préparation	± 24 h	< 20 min	< 10 min
Type de microscope adapté	Microscope inversé si utilisation de chambre de sédimentation Microscope droit si utilisation d'hématimètre	Microscope inversé si utilisation de chambre de sédimentation Microscope droit si utilisation d'hématimètre	Microscope droit
Volume d'échantillon nécessaire	Faible	Faible	Élevé
Délai d'analyse	Dépendant du temps de sédimentation	Dans la journée	Dans la journée
Agent chimique à ajouter	Lugol	Lugol	Aucun
Effet sur les cellules	Risque de déformation des cellules par le Lugol Efficacité moindre sur cellules flottantes	Risque de déformation des cellules par le Lugol Efficacité moindre sur cellules flottantes	Si la filtration n'est pas faite avec précaution, risque de déformation des cellules Meilleure efficacité sur cellules flottantes
Nombre de champs à compter	Du fait d'un volume moindre, beaucoup de champs doivent être comptés (jusqu'à 400 unités)	Du fait d'un volume moindre, beaucoup de champs doivent être comptés (jusqu'à 400 unités)	Du fait d'un plus grand volume, moins de champs ont besoin d'être comptés (jusqu'à 40 unités)
Distribution des cellules dans la chambre	Naturellement irrégulière	Parfois concentration plus importante dans certaines zones	Naturellement irrégulière

4.5 Identification des cyanobactéries

Avant d'effectuer un dénombrement, une expertise adéquate sur l'identification taxonomique des cyanobactéries est primordiale. Considérant qu'il existe plus de 7 500 espèces de cyanobactéries réparties dans 150 genres (Wehr et Sheath 2003) à travers le monde et environ 300 espèces au Québec (Lavoie et al. 2007), ce travail est fastidieux et nécessite de trouver des méthodes efficaces afin de le simplifier et d'accélérer le temps d'analyse.

4.5.1 Niveau de détermination taxonomique

Une idée reçue est la supposition qu'un entrainement taxonomique poussé, à un niveau adéquat pour la recherche en écologie, est nécessaire pour pratiquer une surveillance des risques liés à la présence des cyanobactéries. D'après Codd et al (1999), une formation pour l'identification des taxons pertinents dans la région où le type de plan d'eau sera surveillé peut être suffisante (cf. exemple en Figures 4.3 et 4.4).

L'identification est en général effectuée à l'espèce pour les taxons bien connus, morphologiquement bien différentiables et référencés comme potentiellement toxiques (par ex. *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Planktothrix agardhii*, *Cylindrospermopsis raciborskii*) et au genre, pour les taxons plus difficiles à identifier même si certaines espèces sont possiblement toxiques (par ex. *Oscillatoria* sp., *Woronichinia* sp., *Aphanocapsa* sp, *Pseudanabaena* sp., etc.). L'inconvénient d'identifier à l'espèce est que cela demande plus de temps et il peut facilement y avoir des erreurs d'identification (par ex. confusion entre *Microcystis aeruginosa* et *Microcystis wesenbergii*). Cependant, d'après Graham (2006), puisque la production de toxines est dépendante des souches en présence, l'identification taxonomique seule ne peut être utilisée pour déterminer si des sous-produits toxiques seront présents, même si les genres contenant ces souches peuvent être identifiés. Dans le cadre de notre enquête nous avons déterminé qu'environ 55% des laboratoires ayant un objectif de gestion s'attachent à identifier les cyanobactéries jusqu'à l'espèce lorsque cela est possible. Cette proportion s'élève à 75% pour les laboratoires de recherche fondamentale (Annexe 7).

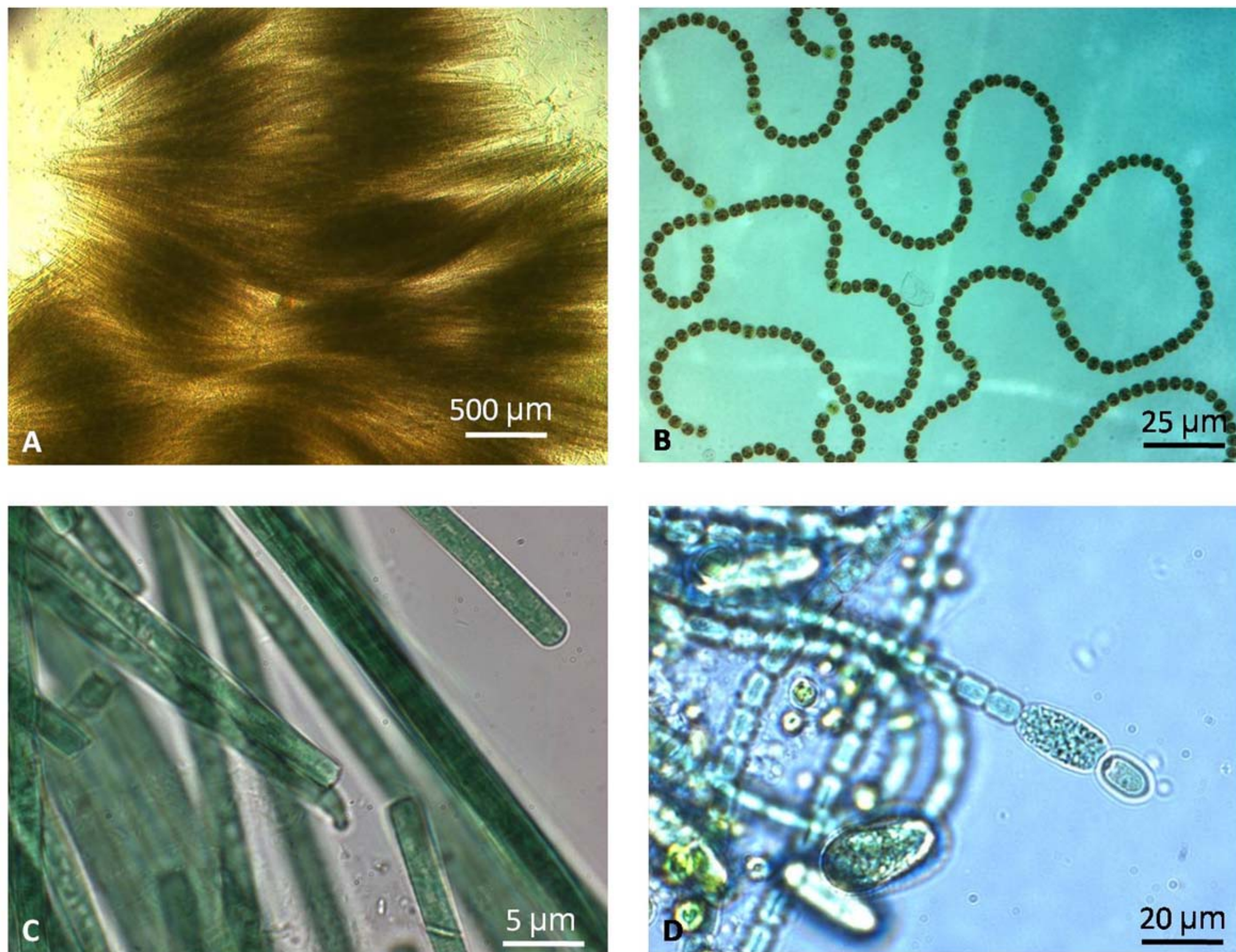


Figure 4.3 **Exemple de cyanobactéries filamenteuses rencontrées en climat tempéré, photographiées dans des échantillons de lacs du Québec (D. Rolland) : (A) *Aphanizomenon flos-aquae*, (B) *Anabaena flos-aquae*, (C) *Oscillatoria* sp., (D) *Cylindrospermum majus***

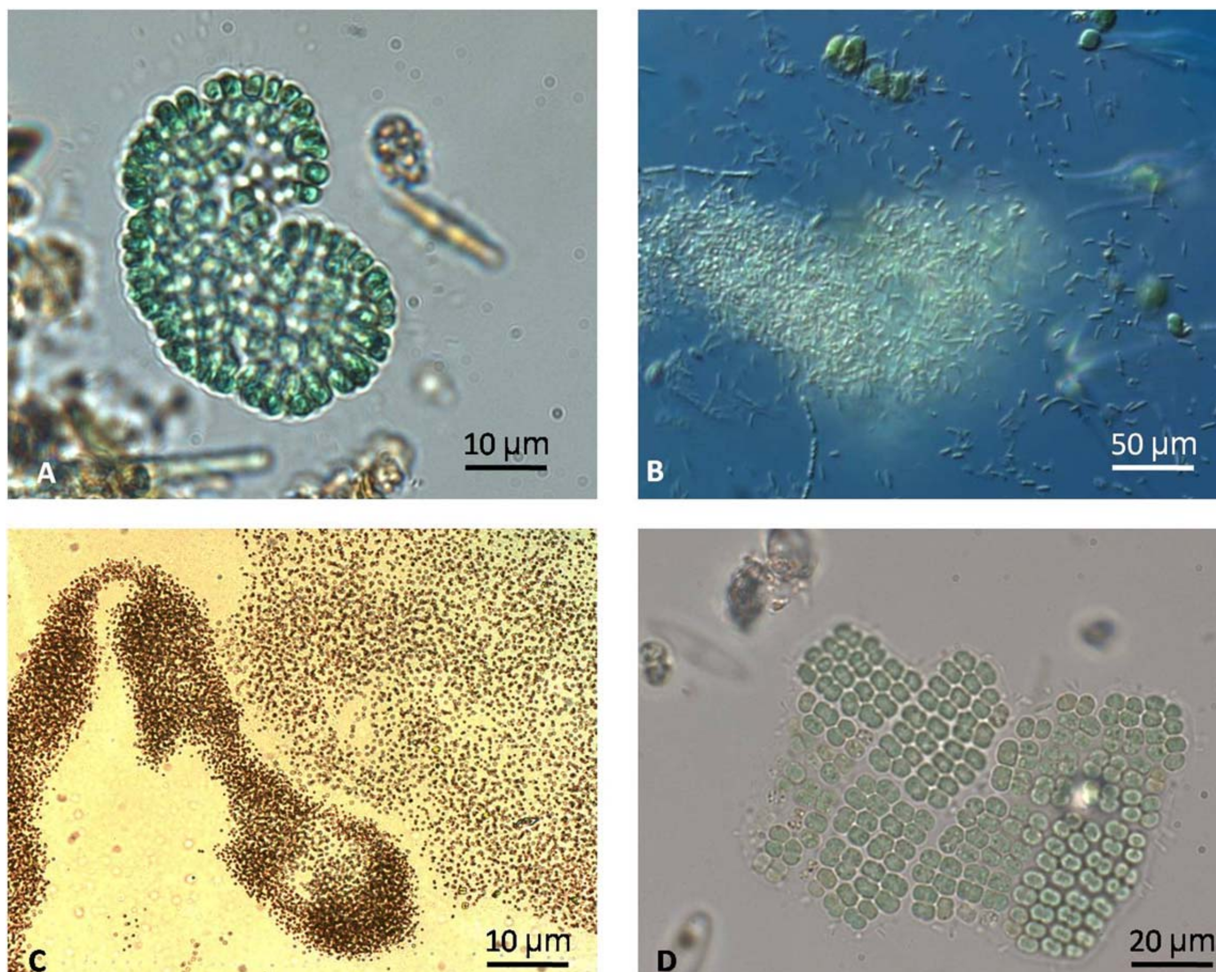


Figure 4.4 Exemple de cyanobactéries coloniales rencontrées en climat tempéré, photographiées dans des échantillons de lacs du Québec (D. Rolland) : (A) *Woronichinia naegeliana*, (B) *Aphanothece* sp., (C) *Microcystis aeruginosa*, (D) *Merismopedia* sp.

4.5.2 Référentiels d'identification

L'identification taxonomique est généralement effectuée à partir d'ouvrage de taxonomie, de manuels d'identification et de clés spécifiques aux régions (Annexe 6). Cependant, il n'existe pas de référence taxonomique pour chaque partie du monde. Par conséquent, des ouvrages initialement destinés à une région en particulier auront tendance à être consultés plus largement. L'inconvénient de cette approche est qu'elle peut être une source d'erreur, plus particulièrement lorsque l'identification se fait jusqu'à l'espèce. En effet, la plasticité de morphologie des différentes espèces est dépendante des conditions environnementales telles que le climat, la composition de l'eau et le niveau trophique de l'écosystème.

Par conséquent, une espèce donnée n'aura pas toujours le même aspect à deux endroits donnés du globe. De plus, les différentes écoles de taxonomie et de classification systématiques et les progrès en biologie moléculaire induisent l'utilisation de noms variés pour les mêmes morphotypes.

Par conséquent, la construction de bases de données photographiques dites "géographiques" est nécessaire pour faciliter le travail et éviter les confusions. L'utilisation de microscopes en parallèle avec des caméras vidéographiques ou photographiques montées sur le microscope et connectées à un ordinateur comporte de nombreux avantages. Par exemple, les images numérisées peuvent être envoyées rapidement par courriel pour une consultation ou une discussion auprès d'experts. Elles peuvent également être facilement exposées sur une page internet, référencées dans un catalogue et/ou archivées.

Les projets Européens REBECCA (Relationships between ecological and chemical status of surface waters) et WISER (Water bodies in europe : Integrative Systems to assess Ecological status and Recovery) effectués dans le cadre de la DCE ont permis d'établir une liste harmonisée de taxons phytoplanctonique (23 000 taxons) rencontrés dans les lacs Européens (http://www.freshwaterecology.info/). Par la suite, cette liste a permis de produire des outils (*Taxa Entry Tool* et *Taxa Validation Tool*) offrant ainsi aux usagers une classification systématique commune, les noms valides des taxons et une liste de synonymes. Le Tableau 4.2 donne aussi une liste d'exemple de sites web qui peuvent s'avérer utile pour les analyses de phytoplancton en général. Cependant, même s'il existe une abondance d'informations sur internet, ces sites ne pourront remplacer une formation et des conseils provenant de taxonomistes expérimentés.

Tableau 4.2 Exemples de sites internet utiles pour l'identification du phytoplancton

Nom	**URL**
Algaebase	www.algaebase.org
Integrated Taxonomic Information System	www.itis.gov
Micro*scope	http://starcentral.mbl.edu/microscope/
Plankton*net	www.planktonnet.eu
Base de données EQAT (External Quality Assessment Trials Phytoplankton)	http://www.planktonforum.eu/

4.5.3 Approche d’identification

Tout d’abord, il faut observer la forme générale des unités, ainsi que leur organisation (unicellulaire, coloniale ou filamenteuse) à faible grossissement (objectifs 4x ou 10x). Il est possible d’utiliser une pince ou une tige pour appuyer sur la lamelle et faire tourner les cellules pour les voir dans tous les sens.

- Dans le cas des organismes coloniaux, il faut ensuite noter si la colonie est globuleuse, plate ou cubique.
- Dans le cas des organismes filamenteux, il faut noter si les trichomes sont mucilagineux ou non, déterminer leur forme générale (droits, incurvés, en spirale), et la présence de différences morphologiques à une extrémité (hétéropolarité) ou au deux (isopolarité) (Figure 4.5).
- En ce qui concerne les cellules végétatives, il est possible de distinguer cinq formes de base (Figure 4.5). La forme des cellules ainsi que la surface de contact entre les cellules va ensuite permettre de déterminer les genres. Par exemple, certains taxons ont les parois transversales égales ou quasi-égales à la largeur de la cellule (*Planktothrix*). Dans d'autres cas, il y a une constriction de la paroi transversale et la surface de contact entre les cellules est beaucoup plus faible (*Anabaena*).
- Parfois les filaments montrent aussi des cellules différenciées, telles que les hétérocystes et les akinètes (Figure 4.5). Dans ce cas, il est aussi important d’identifier leur position, leur forme et leur distribution (solitaire ou en groupe).

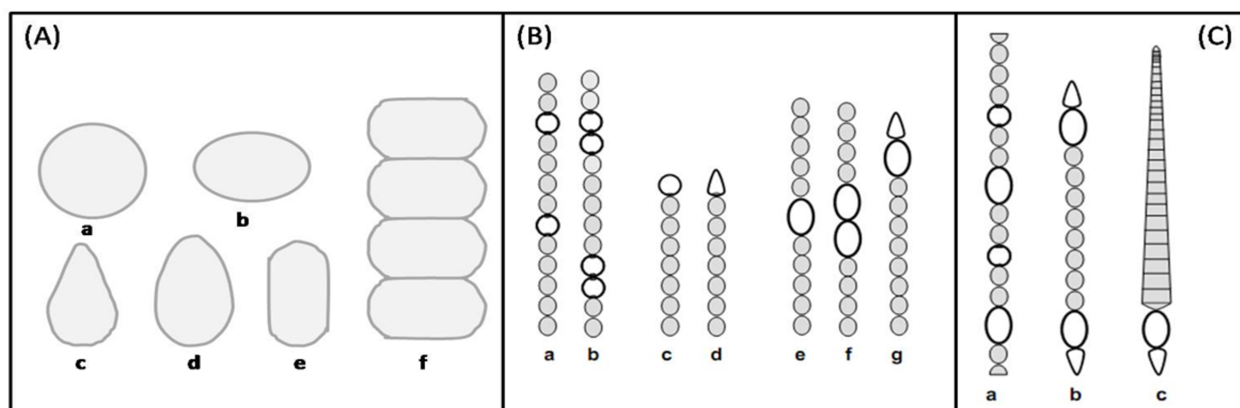


Figure 4.5 **Formes schématisées des cyanobactéries.** ***(A) Formes des cellules végétatives. a: sphérique, b: ovale, c: piriforme, d: ovoïde, e: cylindrique, f: filament avec cellules en forme de petits tonneaux. (B) Forme, position et distribution des hétérocystes et akinètes. a, b, c et d: hétérocystes, e et f: akinètes, g: les deux. (C) Forme des trichomes. a: trichome isopolaire homogène (akinètes et hétérocystes à distances équivalentes), b: trichome isopolaire symétrique, c: trichome hétéropolaire (d'après Kruk et al. 2009)***

4.5.4 Systèmes d'analyse d'images automatisés

Des systèmes d'analyse peuvent aussi être automatisés, c'est-à-dire calibrés de façon à ce que les taxons présents dans l'échantillon soient reconnus et dénombrés. L'analyse automatisée à l'aide d'images a le potentiel de réduire le temps nécessaire pour estimer l'abondance une fois le système de reconnaissance bien établi (banque d'images pré-identifiées), et peut aussi fournir des informations détaillées sur la morphologie des filaments ou des colonies de cyanobactéries.

Ce type d'analyse a surtout été utilisé pour le phytoplancton marin eucaryote (Culverhouse et al. 2006). Cependant, quelques experts ont développé des systèmes d'identification et de mesure pour les cyanobactéries (Congestri et al. 2000; Walsby et Avery 1996) en utilisant les propriétés de fluorescence pour les distinguer des autres groupes phytoplanctoniques. Par exemple, Almesjö et Rolff (2007) utilisent le logiciel Leica QWin pour identifier et mesurer les filaments d'*Aphanizomenon* sp. et *Trichodesmium* sp. (*Leica Microsystems Ltd.*, Cambridge, UK). Almesjö et Rolff (2007) ont estimé la longueur totale des filaments avec la procédure semi-automatisée (correction manuelle des erreurs d'identification) et l'ont comparée avec la longueur totale estimée par microscopie inversée. L'expérience a révélé une très bonne corrélation des résultats ($R^2 = 0,96$). Cependant, la procédure

totalement automatisée n’est pas aussi efficace et a surestimée la quantité de filament de 23% par rapport à la procédure semi-automatisée. Ce type de système n’est pas destiné à l’identification de plusieurs espèces et est plus approprié pour des situations où seule(s) une ou deux espèces de cyanobactéries dominent. De plus, les formes hélicoïdales (par ex. *Anabaena flos-aquae*) ainsi que la fluorescence irrégulière de certaines espèces (par ex. *Aphanizomenon* sp.) peuvent être aussi d’importantes sources d’erreur d’estimation.

4.6 Dénombrement des cyanobactéries par microscopie

L’utilisation d'un microscope inversé avec des chambres de comptage est généralement l’approche la plus utilisée pour dénombrer les cyanobactéries par les laboratoires d’analyse à travers le monde. Selon notre enquête, environ 55% des laboratoires effectuant des analyses de cyanobactéries dans un objectif de gestion utilisent la technique Utermöhl. Cette proportion s’élève à environ 80% dans le cas des laboratoires de recherche fondamentale (Annexe 7). Cependant, un microscope standard est suffisant pour les échantillons pré-concentrés ou pour des échantillons naturellement denses, à condition que le volume de la goutte d’eau dans laquelle les cellules seront énumérées puisse être défini (par ex. à l'aide d'une micropipette ou en utilisant un hématimètre; Lawton et al. 1999). Si possible, il convient de réaliser une observation préliminaire des échantillons vivants avant le comptage, étant donné que la conservation masque souvent des caractères d’identification spécifiques. Les échantillons vivants permettent d’utiliser l’auto-fluorescence de la Chl-a pour faire la distinction entre de petites cyanobactéries et les eubactéries (Laplace-Treyture et al. 2009).

4.6.1 Méthode Utermöhl par microscopie inversée

La méthode Utermöhl (1958) est la méthode la plus généralement employée (Annexe 7) et suit la recommandation de la norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (CEN 2006) adoptée au niveau Européen. Cette méthode de microscopie nécessite une fixation préalable au Lugol (cf. section 4.2.2.1) ainsi qu’une étape de concentration par sédimentation (cf. section 4.4.1). L’approche de comptage employée par la suite est la même que pour toutes les autres méthodes de microscopie (cf. section 4.6.4.).

Chaque chambre de comptage utilisée doit être différenciée des autres car l'aire et le volume interne varient toujours un peu. Ces paramètres doivent donc être mesurés précisément. La méthode conventionnelle proposée par le CEN (2006) est la suivante :

- Peser le kit au complet (chambre de comptage + lamelle de recouvrement + colonne d'un volume déterminé) vide puis rempli avec de l'eau distillée. La différence en gramme est équivalente au volume en millilitre. Cette opération doit être répétée trois fois afin d'obtenir un volume moyen de la chambre. Cette étape peut être ignorée dans le cas où la densité des cyanobactéries dans l'échantillon est très importante (échantillon pris dans efflorescence ou écume).
- Le diamètre de la chambre doit être mesuré en utilisant un vernier. La moyenne de cinq diamètres doit être calculée et utilisée dans la formule πr^2 pour obtenir l'aire.

4.6.2 Utilisation de cellules de numération pour microscope conventionnel

Le comptage par microscopie standard se fait à l'aide de cellules de numération (hématimètres) de Malassez (1 µL), Nageotte (50 µL) ou Neubaeur (60 µL) (Figure 4.6), en général après concentration par filtration (cf. section 3.4.2.). Les cellules de Neubaeur et Nageotte sont préférables aux cellules de Malassez en raison de leur plus grand volume. Cette méthode est plus rapide car elle ne nécessite pas d'attendre la sédimentation des cellules. Il n'y a pas non plus besoin d'utiliser de Lugol et donc si le temps le permet, pas de conservation-fixation nécessaire et moins de risque d'abimer les cellules fragiles telles que *Microcystis aeruginosa*. De plus, de cette façon, il y a possibilité d'utiliser l'auto-fluorescence de la Chl-a pour faire la distinction entre les picocyanobactéries et les eubactéries.

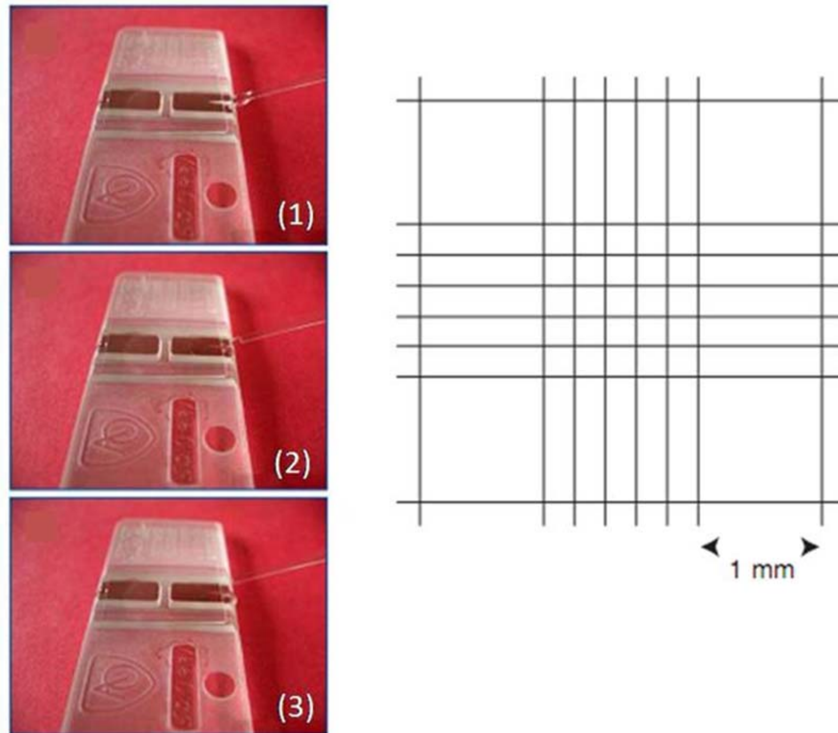


Figure 4.6 **Cellule de numération de Neubaeur.** ***A gauche: remplissage de la cellule à l'aide d'une pipette Pasteur. A droite: grille de mesure intégrée à la cellule (d'après Le Gresley et McDermott 2010)***

Une autre possibilité lorsqu'on travaille avec un microscope standard est d'utiliser des chambres de sédimentation de petit volume de type Sedgewick-Rafter (1 mL) (Figure 4.7), Lund (0,5-0,6 mL) ou Palmer-Maloney (0,1 mL) (Figure 4.8). Dans ce cas, les directives de la méthode Utermöhl pourront être aussi appliquées. En ce qui concerne les chambres de Sedgwick-Rafter, leur configuration ne permet pas l'utilisation de forts grossissements, ce qui implique que l'identification des cellules plus petites que 10-15 µm est difficile, voir impossible (Wetzel et Likens 2000). Ce problème ne se pose pas pour les chambres de Palmer-Maloney, mais celles-ci présentent l'inconvénient de contenir un très petit volume.

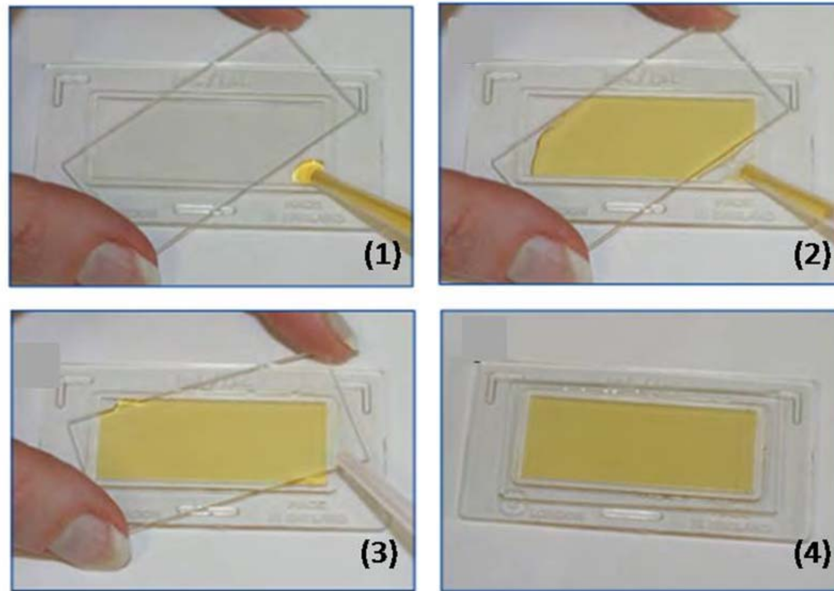


Figure 4.7 **Remplissage de la chambre de type Sedgewick-Rafter à l'aide d'une pipette Pasteur (d'après Le Gresley et McDermott 2010)**

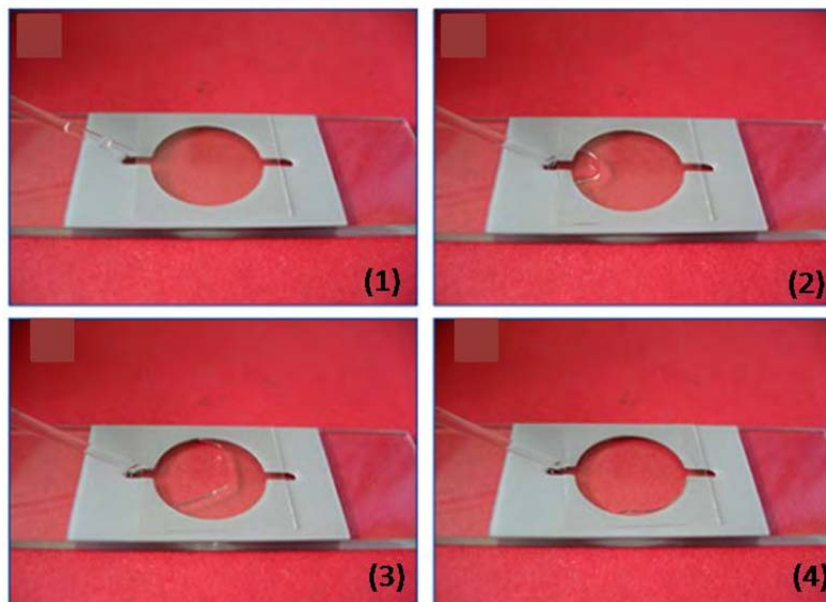


Figure 4.8 **Remplissage de la chambre de type Palmer-Maloney à l'aide d'une pipette Pasteur (d'après Le Gresley et McDermott 2010)**

4.6.3 Utilisation de l'épifluorescence

La microscopie à épifluorescence est une méthode efficace pour améliorer la détection et l'identification dans les échantillons de faible densité algale (10^2 à 10^4 cellules.L^{-1}) et est utilisée relativement fréquemment dans les laboratoires d'analyse (Annexe 7). Dans les échantillons frais ou fixés au formol (et non au Lugol), l'auto-fluorescence de la Chl-a peut être facilement détectée par épifluorescence. De plus, les phycobilines (phycocyanine et phycoérythrine) des cyanobactéries présentent une auto-fluorescence particulière, donc cette méthode est particulièrement bien adaptée pour détecter et compter les petites cyanobactéries coccoïdes (picocyanobactéries). Exposées à une lumière jaune-vert (520-560 nm), les cyanobactéries présentant une dominance de phycocyanine vont apparaître rouges (Figure 4.9) et celles présentant une dominance de phycoérythrine vont apparaître oranges (Wetzel et Likens 2000).

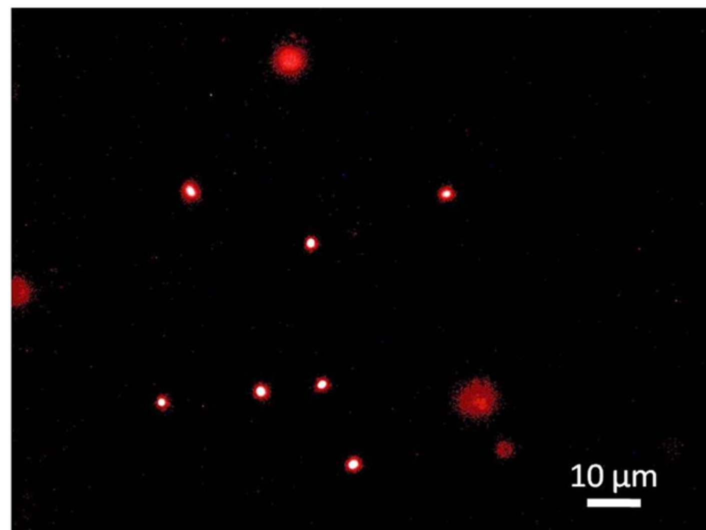


Figure 4.9 Picocyanobactéries émettant une fluorescence rouge lorsqu'exposées à une lumière verte (D. Rolland)

Cette technique nécessite un équipement adapté d'épifluorescence (lampe à mercure 50 ou 100 W) adaptable sur microscope inversé, des lentilles spécifiques pour l'épifluorescence et une série de filtres (Karlson et al. 2010). Il est aussi possible d'induire de la fluorescence chez certains organismes en utilisant des marqueurs (par ex. le DAPI pour les cellules procaryotes).

4.6.4 Approches de dénombrement

4.6.4.1 Grossissements

Il convient que le microscope soit muni de deux oculaires à grand champ, de grossissement 10x ou 12,5x, et que l'un des oculaires soit équipé d'un micromètre oculaire étalonné. Il convient aussi d'utiliser des objectifs 4x et/ou 10x pour une première vision d'ensemble et le comptage de colonies et de filaments. Par la suite des objectifs à contraste de phase 20x et 40x et plan apochromatique 60x ou 100x (à immersion – ouverture numérique > 0,9 et résolution d'environ 0,3 µm) seraient idéal pour les genres de plus petite taille, ou plus difficiles à identifier jusqu'à l'espèce (Lawton et al. 1999). Cependant, l'utilisation de l'objectif 100x ne sera possible que si la lamelle sous la chambre de comptage est suffisamment mince (en général ce n'est pas le cas pour les chambres Utermöhl).

4.6.4.2 Unités à dénombrer

Dénombrer les cyanobactéries implique de définir au préalable les unités qui vont être comptés. La majorité des cyanobactéries planctoniques sont présentes en tant que formes filamenteuses (*Anabaena* sp., *Aphanizomenon* sp., *Planktothrix* sp., etc.) ou coloniales (*Microcystis* sp., *Aphanocapsa* sp., etc.), c'est à dire consistant en un grand nombre de cellules qui sont souvent difficiles à distinguer les unes des autres. La précision de l'analyse est fonction du nombre d'objets comptés (par exemple des cellules ou des colonies). En effet, l'erreur relative est approximativement inversement proportionnelle à la racine carrée du nombre d'objets comptés (Lawton et al. 1999). Par conséquent, plus le nombre d'objets comptés sera important, plus l'analyse sera précise.

Les filaments et colonies peuvent différer considérablement en ce qui concerne le nombre de cellules qui les compose, par conséquent les résultats indiquant uniquement le nombre de colonies donnent peu d'informations sur la quantité de cyanobactéries.

En règle générale:

- Les espèces unicellulaires sont dénombrées en cellules.mL^{-1};
- Les espèces filamenteuses sont habituellement comptées en nombre de filaments puis en cellules par millilitre en estimant un nombre moyen de cellules par filament. Pour obtenir cette moyenne, la méthode proposée est de dénombrer la quantité de cellules composant les 30 premiers filaments rencontrés (Lawton et al. 1999). La longueur de filament total par millilitre peut aussi être évaluée en faisant la somme de chaque filament rencontré et mesuré à l'aide

d'une règle et d'un quadrillage placé dans l'oculaire du microscope. Cette dernière approche est plus précise lorsque la longueur du filament est très variable;

- Pour les espèces coloniales, la désagrégation préalable des colonies et un dénombrement ultérieur des cellules individuelles est préférable à un dénombrement des colonies et une estimation de leur taille (Box 1981). La désintégration des colonies peut être obtenue par hydrolyse alcaline (80 à 90°C pendant 15 min, suivie par un mélange intensif; Box 1981) ou une exposition à de légers ultrasons (Reynolds et Jaworski 1978), après quoi l'échantillon peut être homogénéisé par agitation douce. Les colonies de Phaeocystis dans le Lugol acide se désintègrent cependant après quelques jours de conservation (CEN 2006);
- Si cette approche est impossible, le volume géométrique des colonies individuelles peut être estimé. Si les colonies sont relativement homogènes en taille, le nombre moyen de cellules par colonie peut être déterminé et ensuite les colonies seront comptées. C'est cette dernière solution qui est la plus largement utilisée pour les analyses en routine (Annexe 7). En règle générale, l'utilisation de valeurs publiées pour le nombre de cellules par colonie n'est pas recommandée car la taille des colonies varie considérablement.

4.6.4.3 Champs/Transects

Il y a plusieurs approches systématiques pour le dénombrement des cyanobactéries au microscope, mais qui se basent en général sur le dénombrement d'une partie définie de l'échantillon suivi du calcul par rapport au volume total de l'échantillon:

- Compter les cyanobactéries dans des champs choisis au hasard. La position du champ est fixée sans regarder à travers le microscope pour éviter un biais du technicien. La zone de comptage peut être définie par la zone de quadrillage lorsqu'il y en a une, ou par le champ en entier lorsqu'il n'y a pas de quadrillage. En ce qui concerne les unités situées sur les bords du quadrillage, une règle simple adoptée par le CEN (2006) est de compter les cellules en travers des bords en haut et à gauche et de ne pas compter celles en bas et celles à droite. En mesurant le nombre de champs comptés, l'aire d'un champ, l'aire de la chambre ainsi que son volume, il est ensuite possible d'estimer le nombre de cellules.mL^{-1};
- Compter les cellules dans des transects d'un bord de la chambre vers l'autre. La plupart du temps, on peut se servir du quadrillage d'un oculaire pour définir les marges du transect. En mesurant le nombre de transects comptés, l'aire d'un transect, l'aire de la chambre ainsi que

son volume, il est ensuite possible d'estimer le nombre de cellules.mL^{-1}. Cette méthode est préférable puisque les cellules sont presque toujours plus denses au milieu ou autour de la circonférence de la chambre du fait des courants de convection inévitables (Lawton et al. 1999). Par ailleurs, elle permet de faire un décompte statistiquement valide lorsque le nombre de cellules déposées sur le fond de la chambre n'est pas suffisant pour utiliser des champs.

4.6.4.4 Effort de comptage

Mischke et al. (2012) ont ajouté des recommandations quand à l'effort de comptage préalablement conseillé par le CEN (2006) et Utermöhl (1958). Les auteurs recommandent de:

- Commencer à un petit grossissement (40x ou 100x) dans la chambre en entier afin de dénombrer les filaments et colonies selon des transects horizontaux (Figure 4.10);
- Compter deux transects à un grossissement intermédiaire (200x) afin d'énumérer les taxons < 20 µm selon des transects en diagonale (Figure 4.10);
- Terminer par un comptage à fort grossissement (400x ou 1000x) pour énumérer les plus petits taxons. Pour cette étape, il est recommandé de compter 50 à 100 champs choisis au hasard, c'est-à-dire au moins 400 unités cellulaires si la concentration a été réalisée par sédimentation, et seulement 40 unités cellulaires si la concentration a été réalisée par filtration (Communication personnelle avec Mr Luc Brient).

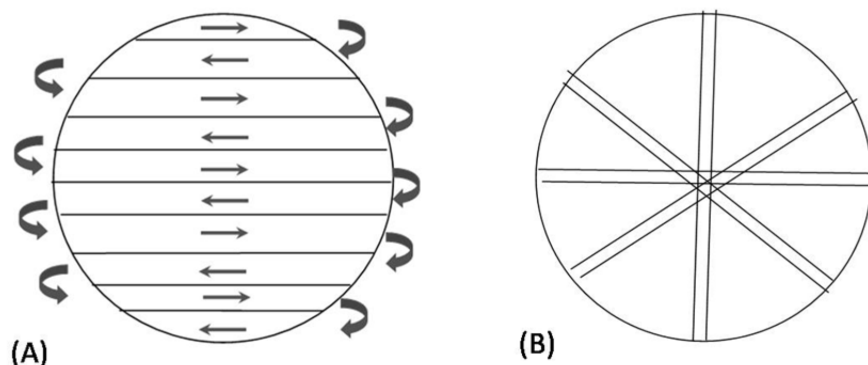


Figure 4.10 (A) Méthode de comptage pour la chambre en entier selon des transects horizontaux; (B) Méthode de comptage selon des transects en diagonale (d'après Laplace-Treyture et al. 2009)

4.6.4.5 Picocyanobactéries

En général, les picocyanobactéries (taille comprise entre 0,2 µm et 2 µm) ne sont pas dénombrées dans le cas de procédures de gestion des épisodes d'efflorescences puisque cela demande plus de temps, mais elles tendent à l'être de plus en plus souvent, particulièrement lorsque des genres à potentiel toxique ont tendance à dominer la communauté (*Aphanocapsa* et *Aphanothece,* Nicholson et al. 2007). Par ailleurs, ces cellules ont été sous étudiées dans le passé étant donnée une préservation souvent inadéquate (fixation au Lugol, conservation à température ambiante ou au réfrigérateur) pour ces petites cellules difficiles à observer et identifier. Les plus petites cellules sont généralement aussi les plus abondantes. Un intérêt de plus en plus marqué a donc été porté par les écologistes aquatiques au picoplancton et à son rôle fonctionnel au sein du réseau trophique microbien (Van Hove et al. 2008). Bien qu'en général moins importantes que celles des bactéries, la biomasse et la production du picophytoplancton, et particulièrement celles des picocyanobactéries, est la source de carbone majeure dans de nombreux écosystèmes aquatiques (Agawin *et al*. 2000; Bell et Kalf 2001). Il peut donc être particulièrement intéressant de dénombrer les picocyanobactéries dans le cadre d'études de la dynamique des cyanobactéries. Cependant, à cause de leur petite taille et de caractères morphologiques insuffisamment distincts, une discrimination taxonomique des picocyanobactéries basée seulement sur ces critères est impossible (Callieri 2007). L'emploi de la cytométrie en flux (cf. section 4.7.1), de l'épifluorescence (cf. section 4.6.3) et/ou de techniques d'analyses moléculaires se révèle donc indispensable. Dans le cadre de notre enquête, il est apparu que 45% des laboratoires ayant un objectif de gestion effectuent le dénombrement des picocyanobactéries. Cette proportion est de 40% dans le cas des laboratoires de recherche fondamentale (Annexe 7).

4.6.5 Calcul de biovolume

Le calcul du biovolume (et ensuite de la biomasse) s'avère nécessaire pour une évaluation précise de l'importance des cyanobactéries dans un plan d'eau étant donné la grande étendue de taille cellulaire pour ce groupe, et le biais occasionné par une simple détermination de la densité (nb de cellules mL^{-1}). A ce jour, aucune norme standardisée ne couvre les méthodes de calcul de biovolume.

La plupart des densités seuils dans le monde étant encore exprimées en cellules.mL^{-1} (sauf en Australie), cette étape peut être évitée dans un contexte de gestion par souci de temps. Cependant, il apparaît qu'environ 50% des laboratoires ayant un objectif de gestion, et 80% des laboratoires de recherche prennent le temps d'effectuer ce calcul (Annexe 7).

4.6.5.1 Modèles géométriques

A l'heure actuelle, le plus haut degré de précision (taxonomique et géométrique) est assuré par des mesures au microscope optique en allouant des formes géométriques en 3 dimensions aux taxons de phytoplancton. Les formes géométriques utilisées pour la détermination du biovolume doivent être assez proches de la forme réelle de l'organisme, mais en même temps facilement discernable et mesurable lors de l'analyse de routine.

Hillebrand et al. (1999) ont proposé d'étendre cette approche à 850 taxons en tentant d'éliminer les sources d'erreur détectées dans les modèles proposés précédemment. Ces équations ont été conçues pour minimiser l'effort de mesure par microscopie. Il est en effet essentiel de faire des compromis entre la précision et l'aspect pratique et rapide des méthodes employées. Les écologistes sont encore partagés entre les deux choix suivants : le phytoplancton doit être associé à des formes géométriques complexes (ce qui nécessite beaucoup de temps) mais semblable à la forme réelle des cellules, ou à des formes simples (analyse plus rapide) mais moins précises (Vadrucci et al. 2007).

Les formes géométriques des taxons de cyanobactéries sont généralement plus simples (sphère, cylindre, etc.) (Tableau 4.3) que celles des autres groupes phytoplanctoniques. Cette méthode est donc bien adaptée pour l'analyse en routine du biovolume des cyanobactéries dans les plans d'eau. Toutefois, l'absence d'un ensemble standardisé de formes géométriques et d'équations pour calculer le biovolume entraîne des difficultés et produit des données qui ne sont pas comparables entre elles. Cette approche peut aussi conduire à des résultats biaisés. En effet, un halo lumineux autour de la cellule peut masquer les dimensions réelles, en particulier dans le cas de petites cellules (Montagnes et al. 1994). Cependant, les erreurs d'estimation de biovolume sont plus souvent dues à des erreurs de comptage (Hobro et Willén 1977) ou de sous-échantillonnage (Hallegraeff 1977), et à une distribution inégale des cellules dans les chambres de comptage. Sicko-Goad et al. (1977) ont recommandé de calculer un biovolume « *actif* » en soustrayant les structures cellulaires inertes (parois de la cellule et vacuoles) du volume total de cellules. Ce biovolume actif est une estimation plus précise de la biomasse. Cependant, les proportions des constituants cellulaires étant très variables physiologiquement, il est essentiel de mesurer les proportions pour toutes les espèces de chaque échantillon dans de nombreux transects. Ainsi, il devient évident que cette méthode n'est pas pratique pour les estimations courantes de la biomasse algale.

Les modèles géométriques publiés ont tendance à être spécifiques à une région donnée, par exemple la mer Baltique (Olenina et al. 2006), la mer de Chine (Sun et Liu 2003), ou à un type d'écosystème, par exemple les zones de transitions telles que deltas, les lagunes côtières ou les marais salants (Vadrucci et al. 2007).

4.6.5.2 Protocole adapté de Hillebrand et al. (1999), Sun et Liu et al. (2003) et Vadrucci et al. (2007)

4.6.5.2.1 Application des formes géométriques selon les unités à dénombrer

En règle générale, ces formes doivent être appliquées à des cellules individuelles, y compris les espèces coloniales et filamenteuses. Toutefois, lorsque la cellule unique n'est pas facilement identifiable, la forme géométrique peut être appliquée à une colonie entière ou à une partie de filament ou de colonie.

4.6.5.2.2 Détermination microscopique des dimensions linéaires

Les mesures doivent être effectuées à fort grossissement (200x, 400x, 1000x) afin de minimiser les erreurs. Les dimensions linéaires peuvent être mesurées manuellement à l'aide d'un micromètre au cours de la quantification et de l'identification des cellules. Cependant, cela est très fastidieux et nécessite beaucoup de rigueur, et donc l'utilisation de systèmes informatisés d'analyse d'images est recommandée. Ceci favorise l'acquisition semi-automatique des dimensions linéaires, réduisant le temps de travail. En utilisant un logiciel de traitement d'images, il est alors possible de déterminer les informations morphométriques comme la longueur, la largeur, le périmètre, etc. en surlignant les contours des cellules individuelles (cf. paragraphe 4.5.4). Certains programmes contiennent des applications calculant directement le volume des cellules, bien que cela se limite presqu'exclusivement aux cylindres et aux sphères (donc bien adapté pour les cyanobactéries).

Tableau 4.3 Modèles géométriques et équations associées pour le calcul de biovolume des cyanobactéries (d'après Hillebrand et al. 1999)

Forme de la cellule	Équation selon Hillebrand et al. (1999)	Exemples de genres
Sphérique d	$V = \frac{\pi}{6} \times d^3$	*Anabaena*, Aphanocapsa, Gomphosphaeria*, Microcystis, Radiocystis, Chroococcus*
Sphéroïdique allongée Section transversale d Section apicale d h	$V = \frac{\pi}{6} \times d^2 \times h$	*Aphanothece, Coelosphaerium*
Cylindrique Section transversale d Section apicale d h	$V = \frac{\pi}{4} \times d^2 \times h$	*Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Limnothrix, Lyngbia, Nostoc, Oscillatoria, Planktothrix, Pseudanabaena*

** Parfois sphéroïdique allongée ou cylindrique.*

La barre d'échelle des micromètres et du système automatisé d'analyse d'image doit être calibrée correctement à chaque grossissement à l'aide d'une barre d'échelle standard montée sur un objectif de microscope. Le problème des halos de lumière, qui affectent les mesures des plus petites cellules, peut être résolu en augmentant le grossissement du microscope.

4.6.5.2.3 Mesure de la troisième dimension

Dans tous les cas les mesures se limitent à deux dimensions, mais pour certaines formes géométriques la mesure de la troisième dimension (épaisseur de la cellule) est nécessaire. C'est le cas par exemple des sphéroïdes allongées (par ex. *Aphanothece*, *Coelosphaerium*). Lorsque c'est possible, il est recommandé de mesurer directement au microscope cette épaisseur. Les espèces abondantes peuvent généralement être observées sous différents points de vue. Ainsi, chaque dimension est visible. Dans ce cas, la moyenne d'une série de mesures peut être utilisée en tant que troisième dimension pour chaque cellule identifiée d'une espèce. En revanche, les espèces rares peuvent être vues sous un seul angle. Dans ce cas, il est recommandé d'utiliser un microscope de bonne qualité avec une vis de mise au point calibrée et équipée d'un potentiomètre, ce qui permet d'estimer la distance parcourue entre le point focal le plus haut (d'un côté de la cellule) et le plus bas (côté opposé de la cellule) représentant l'épaisseur de la cellule. Une autre solution consiste à faire rouler la cellule en tapotant doucement la lamelle avec la pointe d'une pipette pasteur (Sun et Liu 2003) ou d'estimer la profondeur indirectement si le ratio de taille de l'espèce est connu (Menden-Deur et Lessard 2000).

D'après Verity et al. (1992), les espèces dont les dimensions linéaires maximales sont inférieures à 20 µm (la plupart des cyanobactéries coloniales) et de formes sphéroïdes allongées présentent une dimension de profondeur égale à la largeur. Par conséquent, une mesure en deux dimensions serait suffisante pour les cyanobactéries en général, qu'elles soient sphériques, cylindriques ou sphéroïdiques allongées. De plus, la nouvelle génération de microscopes inversés est souvent pourvue de la microscopie confocale et de systèmes d'analyse d'images capables de créer des images en 3D et donc de visualiser et mesurer les cellules dans toutes les dimensions. Ces améliorations sont prometteuses mais une mise au point de ces technologies est encore nécessaire.

4.6.5.2.4 Nombre nécessaire d'unités pour le calcul de biovolume

Il est recommandé d'estimer le biovolume de chaque unité de comptage inclus dans le sous-échantillon analysé. Cette approche exige un grand effort expérimental mais est nécessaire pour une estimation précise des descripteurs morphométriques. Compte tenu de la variation de la taille des cellules de phytoplancton selon la saison, le cycle de la vie, les paramètres paraphysiologiques et les variables environnementales, l'application de valeurs de biovolume moyennes pour certaines espèces tout au long de l'année et dans différents sites peut produire des incertitudes importantes. Il est donc recommandé de calculer le biovolume pour chaque ensemble d'échantillons.

En ce qui concerne le nombre de cellules nécessaires pour mesurer le biovolume, Vadrucci et al. (2007) recommandent de mesurer les dimensions linéaires de toutes les unités dénombrées. Cela contraste avec ce qui a été proposé par Sun et Liu (2003) qui conseillent de mesurer, pour chaque échantillon de phytoplancton, au moins 10 cellules sélectionnées au hasard pour chaque espèce. Smayda (1978) et Hillebrand et al. (1999), quant-à-eux, suggèrent de prendre 25 cellules sélectionnées au hasard pour chaque espèce afin de mesurer le biovolume.

4.6.6 Validation des résultats

Cette étape doit être effectuée avant la mise en place d'un protocole de routine et doit être répétée lorsqu'un changement de procédure, d'instrument ou de personnel est susceptible d'affecter le résultat de l'analyse. En effet, la validation n'est pas nécessaire pour chaque échantillon ou chaque lot d'échantillons. Pendant les analyses, des mesures de contrôle de qualité (cf. section 4.6.7) à chaque étape doivent cependant être effectuées pour tous les échantillons afin de garantir le maintien des performances évaluées lors de la validation.

La validation doit être effectuée de préférence sur une série d'échantillons naturels représentatifs du type d'eau analysé, ou encore sur des échantillons enrichis avec des taxons provenant de culture en laboratoire. Il est important qu'au moins une très petite espèce (< 5 µm) avec un taux de sédimentation faible, ainsi qu'une espèce plus grosse (≥ 25 µm) avec une vitesse de sédimentation élevée, soient inclues dans l'échantillon lors de la validation.

Les étapes de validation suivantes sont recommandées (CEN 2006) :

4.6.6.1 Homogénéisation

Il est nécessaire de comparer des réplicats pour déterminer le temps et l'intensité d'agitation minimum permettant d'obtenir une bonne reproductibilité des résultats. Le dénombrement peut ensuite être comparé en utilisant des tests paramétriques standards si la distribution des données est normale.

4.6.6.2 Sous-échantillonnage

L'erreur du sous-échantillonnage peut être estimée par la loi statistique de Poisson (la variance est égale au nombre moyen d'objets). Par exemple, un sous-échantillon de 1 mL, avec une moyenne de 10 000 objets.mL^{-1} ou plus dans l'échantillon, aura un coefficient de variation de moins de 1%, donc négligeable. Cependant, pour chaque espèce ayant une faible abondance, l'erreur de sous-échantillonnage pourrait devenir significative.

4.6.6.3 Distribution aléatoire des particules dans la chambre

Quand il apparaît que les objets sont distribués de façon aléatoire, sans agglutination significative ou de tendance centrifuge ou centripète, l'hypothèse d'une distribution aléatoire doit tout de même être testée. Les données utilisées pour cette analyse sont obtenues en dénombrant deux transects perpendiculaires dans plusieurs champs du microscope (deux séries de données). Il faut ensuite déterminer:

- La répartition globale - Il faut déterminer le *ratio de la variance par rapport à la moyenne*. Si aucune des deux distributions de données n'est en accord avec une série de Poisson, les résultats de dénombrement ne peuvent pas être considérés comme fiables.
- L'ordre aléatoire d'apparition - Lorsque plus d'un taxon est pris en compte dans l'analyse, une deuxième étape de la procédure de validation est de tester si les observations successives sont indépendantes (la probabilité de compter un taxon spécifique est indépendante du taxon compté précédent). Ce caractère aléatoire peut être testé avec un *run-test*. Les mêmes données collectées pour évaluer la répartition globale des objets peuvent être utilisées.

4.6.6.4 Erreur de mesure, répétabilité et reproductibilité

Les résultats quantitatifs doivent être évalués sur au moins deux des espèces les plus nombreuses. *L'erreur de mesure* doit être comparée avec *l'erreur aléatoire attendue* basée sur les statistiques de Poisson pour avoir un aperçu de la performance de la procédure et de l'analyste. La *répétabilité* peut être évaluée en recomptant une deuxième fois la même chambre. La *reproductibilité* peut être évaluée en recomptant un ensemble représentatif d'échantillons dans des conditions différentes et par différents analystes (tests inter-laboratoires). Le dénombrement peut ensuite être comparé par des tests paramétriques standards si la distribution des données est normale.

4.6.6.5 Incertitude de la mesure

L'incertitude associée au résultat d'une analyse microscopique englobe les incertitudes de l'ensemble de la procédure (échantillonnage, stockage, sous-échantillonnage, homogénéisation, identification et quantification). Une distinction claire doit être faite entre l'incertitude quantitative et qualitative:

- L'incertitude qualitative se réfère à la non-identification ou l'identification erronée des taxons. Elle peut être exprimée sous la forme d'un pourcentage maximal de mauvaise identification, basé sur des tests de comparaison inter et intra-laboratoires.
- L'incertitude quantitative peut être considérée comme la somme de la reproductibilité intra-laboratoire et la justesse. La *justesse réelle* est difficile à évaluer mais la *justesse relative* peut être dérivée de la déviation de la note moyenne dans les études inter-laboratoires. Une autre approche peut être obtenue en utilisant une autre méthode comme référence, par exemple l'utilisation d'une chambre Sedwick-Rafter ou la cytomètrie en flux.

4.6.7 Assurance contrôle qualité

Le choix des méthodes d'analyse des cyanobactéries requiert de considérer les sources de variabilité et d'erreur à **chaque étape** du processus de surveillance. Par conséquent, un contrôle de la qualité de chaque étape de la procédure doit être mis en œuvre par les analystes. L'Assurance Qualité (AQ) comporte deux aspects : les contrôles de qualité internes et les contrôles de qualité externes (Figure 4.11).

4.6.7.1 Contrôles de qualité internes

Plusieurs recommandations de contrôle de qualité sont présentées dans les protocoles standardisés et les guides suivants: CEN (2006), Chorus et Bartram (1999), Hötzel et Croome (1999), Mischke et al. (2012), NATA (2006). *Le contrôle de qualité concernant les étapes d'échantillonnage, de conservation et de stockage est présenté dans la section 3.2.8.*

Si un volume fixe prélevé à la pipette est utilisé pour toutes les analyses, celles-ci doivent être calibrées chaque année.

4.6.7.1.1 Concentration

1. Lorsqu'une sédimentation incomplète est observée, ou lorsque des cyanobactéries flottantes peuvent être présentes, l'eau de la couche supérieure de la chambre de sédimentation doit être centrifugée afin d'estimer si la quantité de cellules flottantes est significative. Si la densité est significative, les vésicules de gaz doivent être vidées (cf. section 4.4.1);
2. Après la sédimentation, le patron de distribution des particules dans la chambre doit être vérifié en utilisant le plus petit grossissement du microscope. Cette distribution doit être *aléatoire*, c'est-à-dire irrégulière et caractérisée par de nombreux espaces vides. Dans le cas contraire (par exemple distribution concentrique des grosses particules sur les bords de la chambre et les petites particules au centre), l'étape de sédimentation doit être reprise en veillant à ce que la température de la chambre soit la même que celle de l'échantillon pour éviter les effets de convection.

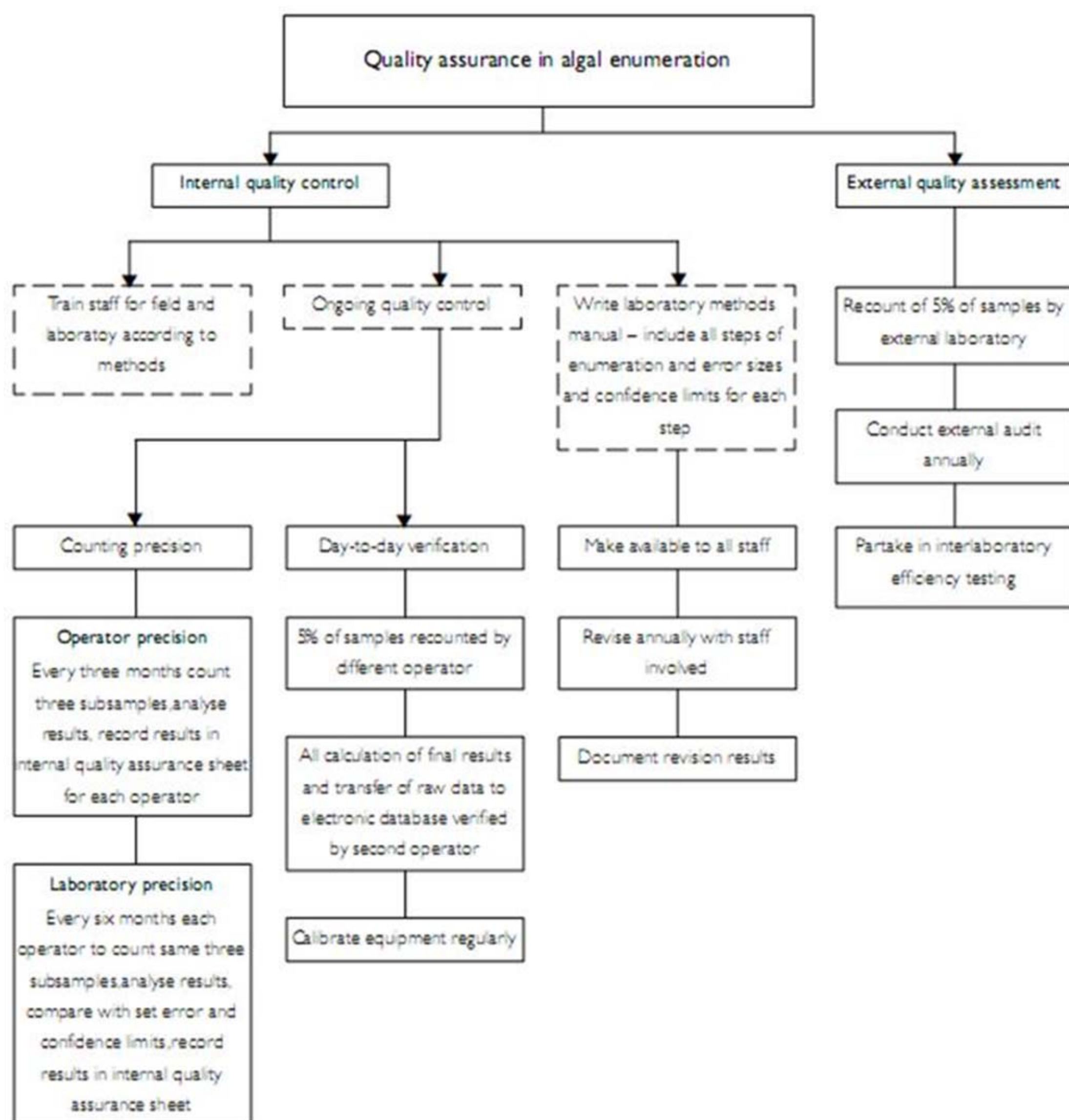


Figure 4.11 Procédure d'Assurance Qualité dans les protocoles d'énumération du phytoplancton (tiré de Hötzel et Croome 1999)

4.6.7.1.2 Identification

1. Les informations relatives à la calibration des microscopes, des chambres, des oculaires et/ou des objectifs doivent être conservées dans un cahier de laboratoire comme référence et cette calibration doit être vérifiée avant chaque analyse;
2. Une liste taxonomique préliminaire doit être disponible pour consultation durant l'analyse de l'échantillon fixé. Des différences taxonomiques significatives entre cette liste et l'échantillon doivent être rigoureusement examinées (par ex. espèce dominante différente);
3. Un taxon identifié comme rare dans la région à l'étude doit être mis en évidence et son identification doit être confirmée par un expert;
4. Une attention particulière doit être accordée aux compétences du technicien dans le cas d'analyses rarement exécutées;
5. Une identification sommaire des cyanobactéries doit être complétée lors de contrôles de qualité périodiques effectués par les experts d'une équipe de surveillance pour assurer une reconnaissance adéquate des genres importants.

4.6.7.1.3 Dénombrement

1. Pour tester la *précision* d'un analyste, un dénombrement en réplicats d'une certaine proportion d'échantillons doit être effectué par un autre technicien pour évaluer l'*erreur de* l'analyse (tous les 3 mois);
2. Au sein du laboratoire, 3 sous-échantillons d'un même échantillon sont dénombrés par tous les techniciens et l'*erreur* est calculée (tous les 6 mois);
3. Des révisions régulières des procédures de dénombrement avec l'équipe au complet et la documentation par écrit du moindre changement sont nécessaires;
4. Il est nécessaire qu'un nombre maximal acceptable d'heures soient passées devant le microscope pour éviter les erreurs liées à la fatigue.

4.6.7.1.4 Post-analyse

1. Une vérification du calcul final de la densité algale ou du biovolume doit être effectuée par un autre technicien;

2. Une vérification par le technicien au moment d'entrer les données dans une base et une double vérification par un deuxième technicien sont nécessaires.

4.6.7.2 Contrôles de qualité externes

Pour déterminer la performance des laboratoires, et plus particulièrement leur compétence continue, des comparaisons inter-laboratoires doivent être effectuées (aussi appelées *ring tests*, inter-calibration, *proficiency tests*, essai d'aptitude). Le but de ces exercices est de comparer les performances des laboratoires engagés dans des programmes nationaux officiels ou non de surveillance du phytoplancton et d'autres laboratoires travaillants dans le domaine du phytoplancton. Ces comparaisons inter-laboratoires permettent également de tester la méthode analytique utilisée par chaque laboratoire participant, ainsi que ses limites de détection, limites de quantification, biais, robustesse, précision, justesse, reproductibilité, répétabilité, stabilité, etc. La participation à ce type de programme est devenue une exigence essentielle pour les laboratoires nationaux impliqués dans la surveillance des cyanobactéries et du phytoplancton en général afin d'obtenir l'accréditation de leurs méthodes. Ces programmes d'inter-calibration sont en général ouverts à tous les laboratoires internationaux et fortement recommandés par l'OMS (Codd et al. 1999).

4.6.7.2.1 Exemple de BEQUALM (*Biological Effects Quality Assurances in Monitoring Programs, Europe*)

Chaque exercice de comparaison est conçu pour tester un ou différents aspects de la méthode d'essai. La plupart des laboratoires en Europe utilisent la méthode Utermöhl avec peu de variations de protocole (sauf le volume du sous-échantillon et la stratégie de comptage des cellules), c'est donc cette méthode qui est testée. Le programme BEQUALM propose un exercice de dénombrement comprenant 6 échantillons enrichis avec du matériel de culture à deux concentrations cellulaires différentes (faible et élevée) et un exercice d'identification comprenant un questionnaire taxonomique. L'exercice d'identification comprend 8 questions et 300 points. Les participants reçoivent les échantillons préservés au Lugol et les instructions directement à leur laboratoire, effectuent l'analyse des six échantillons comme à leur habitude et doivent renvoyer les résultats dans les quatre semaines suivantes. La note de passage pour l'exercice est fixée à 70%.

4.6.7.2.2 Exemple d'EQAT (*External Quality Assessment Trials Phytoplankton, Allemagne*)

Des tests d'aptitude sont effectués tous les ans pour vérifier les performances analytiques des participants dans le dénombrement du phytoplancton selon la norme EN 15204 (technique Utermöhl), le calcul des biovolumes et la détermination taxonomique. La conception du test est résumée dans la Figure 4.12. Les échantillons, incluant un échantillon de référence avec micro-particules de concentration connue et un échantillon naturel fixé au Lugol, sont délivrés à tous les participants par courrier. Les tables de données et les photos et/ou vidéos de taxons sont mis en ligne sur une page web. Les analyses sont effectuées avec l'équipement des laboratoires participants et par leur équipe de techniciens de routine. L'évaluation des résultats est ensuite effectuée à l'aide d'une procédure statistique robuste établie selon la méthode standard DIN 38402-A45.

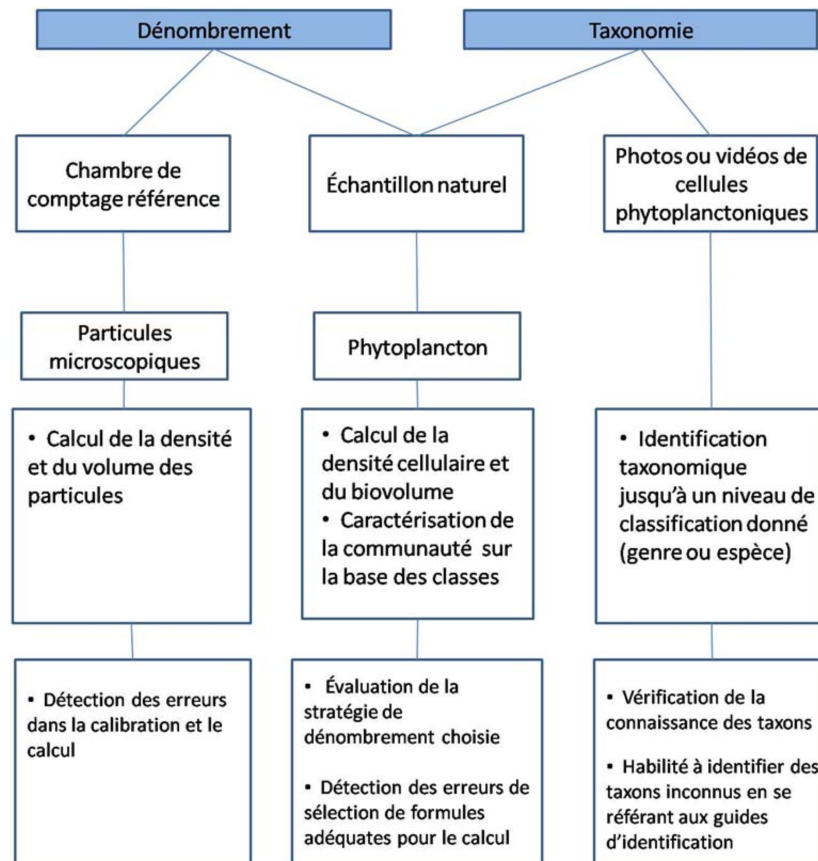


Figure 4.12 Exemple d'approche habituellement utilisée pour les tests d'évaluation de compétence pour le dénombrement et l'identification du phytoplancton (d'après EQAT 2013)

4.6.7.3 Accréditations Nationales

De nombreux laboratoires ont une accréditation nationale pour les techniques décrites dans ce rapport (COFRAC en France, NATA en Australie, IANZ en Nouvelle-Zélande, RvA en Europe). Cela implique le développement de protocoles avec des niveaux de traçabilité et de reproductibilité conformes aux critères définis au départ. La participation à des programmes de comparaisons inter-laboratoires internationalement reconnus permet d'obtenir ou de conserver ces accréditations. Une accréditation n'est cependant pas obligatoire pour pouvoir effectuer des analyses environnementales. Par exemple au Canada, le Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (CEAEQ) effectue des analyses de cyanobactéries selon un protocole rigoureux mais n'est pas un laboratoire accrédité. En effet, ces accréditations impliquent l'application de protocoles laborieux qui ne répondent pas toujours aux objectifs de gestion.

4.6.7.3.1 Exemple de l'accréditation NATA (*National Association of Testing Autorities, Australie*)

L'évaluation des laboratoires doit être structurée selon les exigences techniques d'accréditation biologique énoncées dans le NATA Assessor Resource Kit (2006) qui a été développé pour correspondre aux normes standards ISO/IEC 17025. Les principaux éléments qui doivent être évalués sont :

1. Les qualifications de l'équipe;
2. La collecte et la manipulation des échantillons;
3. La réception des échantillons (critères d'acceptation, identification et stockage);
4. La documentation (méthodes, archives sur la maintenance et la calibration des appareils);
5. La préparation des échantillons (concentration, fixation);
6. La détection (efficacité de l'équipement, calibration et maintenance des appareils, compétences du technicien);
7. L'identification (références taxonomiques, méthodologie et compétence du technicien);
8. Le dénombrement (méthodologie et compétences du technicien);
9. L'enregistrement et le compte rendu des résultats (premiers enregistrements, vérification et autorisation);
10. L'assurance contrôle de qualité (vérifications de qualité, vérifications internes, tests de compétence);
11. La formation de l'équipe (échantillonnage sur le terrain et travail en laboratoire);
12. L'environnement de laboratoire (équipement, ergonomie).

4.7 Autres techniques d’identification et de quantification

Les méthodes traditionnelles consistant à effectuer l’échantillonnage *in situ*, puis identifier et énumérer au microscope les cyanobactéries présentes (Utermöhl 1958), peuvent s’avérer coûteuses et trop laborieuses pour les gestionnaires. De plus, puisque les efflorescences peuvent ne durer que quelques jours (Randolph et al. 2008), plusieurs travaux (par ex. Kutser et al. 2006; Rantajärvi et al. 1998) ont démontré que la fréquence spatiale et temporelle des programmes d’échantillonnage de l’eau ne sont pas adéquates pour mettre en évidence les changements de biomasse cyanobactérienne, spécialement durant les conditions d‘efflorescence, lorsque la variabilité spatiale et temporelle dans la densité de cyanobactéries est particulièrement grande. Cela requiert une instrumentation permettant l'acquisition simultanée de plusieurs caractéristiques à plus haute fréquence d’échantillonnage et sur une plus large couverture spatiale, et ainsi une interprétation plus élaborée des patrons de distribution spatiotemporelle. Ainsi, le plus grand défi pour la surveillance du phytoplancton, et des cyanobactéries en particulier, est d’adapter nos techniques d’analyse à :

1. La vaste gamme de types de particules, leur taille, leur concentration et leur état physiologique.
2. La dynamique des écosystèmes et donc, la nécessité d’adapter l’échantillonnage en prenant en compte les variations à l'échelle temporelle et spatiale.
3. La capacité à fournir des réponses rapides pour permettre, le cas échéant, une alerte précoce.

Deux groupes principaux d’outils ont été détaillés dans cette partie : les outils basés sur les propriétés de fluorescence (cytométrie, sondes submersibles, télédétection) et les outils moléculaires (cette partie ne sera pas développée dans le présent document). En ce qui concerne les outils de fluorescence, seule la cytométrie a pour le moment le potentiel de différencier des genres de cyanobactéries, les sondes et la télédétection permettent d’exprimer un résultat en termes de biomasse totale des cyanobactéries. De plus, les résultats obtenus avec ces méthodes ne permettent pas de comparaison avec les seuils décisionnels en vigueur (cf. section 2) qui s’appliquent seulement dans le cas de méthodes microscopiques.

4.7.1 Cytométrie en flux

4.7.1.1 Principe général

Un cytomètre en flux (CMF) est un compteur de particules qui utilise les propriétés de diffusion de la lumière et d'auto-fluorescence pour différencier les classes de phytoplancton. Il peut également différentier les cellules sur la base de la fluorescence générée par des marqueurs ajoutés (par ex. marqueurs d'ADN propre à un groupe spécifique ou spécifiques à l'état physiologique des cellules). Un cytomètre permet de compter chaque cellule passant devant le laser, et mesurer leurs caractéristiques physiques (taille, forme, structure, fluorescence et contenu chlorophyllien), à raison de plusieurs milliers de cellules par minute. Le cytomètre en flux détecte la capacité d'une cellule à diffracter la lumière incidente (structure interne, densité) et à émettre une fluorescence dans le rouge (> 655 nm pour la Chl-a), l'orange et le jaune (585 à 630 nm pour la phycoérythrine; 635 à 670 nm pour la phycocyanine) ce qui permettra de déterminer la classe phytoplanctonique d'appartenance de chaque population. La taille relative des cellules est déterminée grâce à la lumière diffractée aux petits angles (entre 1 et 10°) qui est détectée sur une photodiode qui convertit le signal lumineux en un courant électrique proportionnel. La lumière diffractée aux grands angles (90°) est proportionnelle à la granularité de la cellule et à son diamètre, et est détectée sur un photomultiplicateur qui convertit le signal lumineux très faible en un signal électronique puis le multiplie. Cette méthode est particulièrement bien adaptée pour mesurer le picoplancton autotrophe et donc les picocyanobactéries. Jusqu'à présent, cette technique a été principalement utilisée en milieu marin (Bell et Kalff 2001; Callieri 2007). Le cytomètre peut être couplé à une caméra qui produit des images de chaque particule ou organisme (par ex. une FlowCAM; Poulton et Martin 2010). Certains cytomètres sont munis d'un séparateur de fraction basé sur les caractéristiques physiques ciblées, permettant d'isoler une population et faire d'autres vérifications par la suite (par ex. validation au microscope).

4.7.1.2 Améliorations techniques et adaptation à la surveillance des eaux continentales

Alors que la plupart des applications de la cytométrie en flux en sciences aquatiques sont encore effectuées en laboratoire, l'accent de ce chapitre a été mis sur le potentiel de cette méthode à être utilisée *in situ*, et exploitée à haute fréquence pour la surveillance des eaux. Initialement, l'application de la cytométrie en flux était limitée aux échantillons unicellulaires puisque le système d'écoulement permettait seulement aux petites particules de passer à travers la gaine (Dubelaar et al. 2004). Il existe

une très grande variété de cytomètres en flux, cependant aucun n'était particulièrement destiné aux sciences aquatiques jusque dans les années 2000. Les instruments les plus souvent utilisés pour l'analyse du phytoplancton étaient ceux provenant de la compagnie *Becton Dickinson* (*FAC Sort, FACS Calibur*) et *Coulter Electronics*. Dubelaar et al. (1999) ont ensuite conçu un instrument, le cytomètre en flux de la série *CytoBuoy*, qui permet d'étendre l'analyse aux cellules et colonies plus grandes et asymétriques (colonies de *Microcystis* sp. par exemple). Une autre amélioration avec *CytoBuoy* est son applicabilité pour des échantillons de terrain naturels non traités, y compris les échantillons riches en sédiments dans lesquels les particules non-vivantes constituent plus de 90% du nombre total de particules (Dubelaar et al. 1999; Dubelaar et Gerritzen 2000). En modifiant l'approche vers un design plus compact et portatif, la technologie de base a été redéfinie pour être moins encombrante et disponible pour différentes plates-formes: *CytoSense*, une version de paillasse pour laboratoires fixes ou mobiles (navires), *CytoSub*, une version submersible pour fonctionner à des profondeurs jusqu'à 200 m, et *CytoBuoy*, la version amarrée (flottant) placée à l'intérieur d'une petite bouée sphérique avec transmission radio des données. Un autre instrument hybride, la *FlowCAM* de la compagnie *Fluid Imaging Inc.* (Edgecomb, ME, USA) combine la technologie de la cytométrie en flux et de la microscopie (Figure 4.13). L'instrument acquiert des images de cellules lorsque le flux d'échantillon passant devant le laser diffuse la lumière et émet des signaux de fluorescence (Sellner et al. 2003). Différents grossissements peuvent être utilisés. L'image de chaque cellule phytoplanctonique est numérisée permettant une évaluation de la taille ou du volume, une identification taxonomique et un dénombrement. L'analyse automatisée des images permettant d'identifier les organismes est possible grâce à une calibration préalable du logiciel. Cependant, l'inspection manuelle des images par un spécialiste de l'identification du phytoplancton est nécessaire pour le contrôle de la qualité et pour la calibration du système.

Les cyanobactéries formant de grandes colonies ou des filaments peuvent poser problème puisque la plupart des cytomètres présentent des limites maximales de taille de particules. L'intérêt principal de la *FlowCAM* est qu'elle permet l'analyse d'une très large gamme de tailles cellulaires (10 à 1 000 µm). Cellamare et al. (2012) ont tout de même pu identifier plusieurs cyanobactéries filamenteuses telles que *Planktothrix rubescens* et *Anabaena flos-aquae* au lac du Bourget en France avec un cytomètre *FACSCalibur*. Les analyses ont été effectuées avec des temps de passage différents en fonction des tailles de cellules (3 min pour les picocyanobactéries et 8 min pour les cyanobactéries filamenteuses). La configuration du cytomètre de flux pour chaque classe de taille a également été adaptée pour détecter toute la communauté.

4.7.2 Sondes submersibles

Il est maintenant assez courant que les gestionnaires de plans d'eau utilisent des sondes de fluorescence pour estimer la biomasse de phytoplancton dans la colonne d'eau directement sur le terrain ou à la prise d'eau. L'utilisation de méthodes de détection des cyanobactéries en temps réel et directement sur le terrain est une avancée majeure. Les propriétés de fluorescence des pigments du phytoplancton et des cyanobactéries a permis de développer des sondes submersibles capables de mesurer la fluorescence *in vivo* (FIV). Ce type de détection ne nécessite pas de manipulation en laboratoire (mis à part la calibration), est rapide et facilement abordable pour un technicien. Par conséquent, l'utilisation de ces sondes est idéale pour effectuer des suivis complets dans le temps (mesures en temps réel, suivi sur de longues périodes) et dans l'espace (profils verticaux, suivi sur les berges). Cet outil peut donc aussi permettre de déterminer plus facilement et plus précisément quand et où un échantillonnage doit être effectué. En effet, considérant les différents patrons de distributions possibles des cyanobactéries dans la colonne d'eau, et du fait de la capacité de migration de certaines espèces, la détection des cyanobactéries par FIV peut être un choix avantageux pour les gestionnaires de plans d'eau récréatifs et d'alimentation en eau potable.

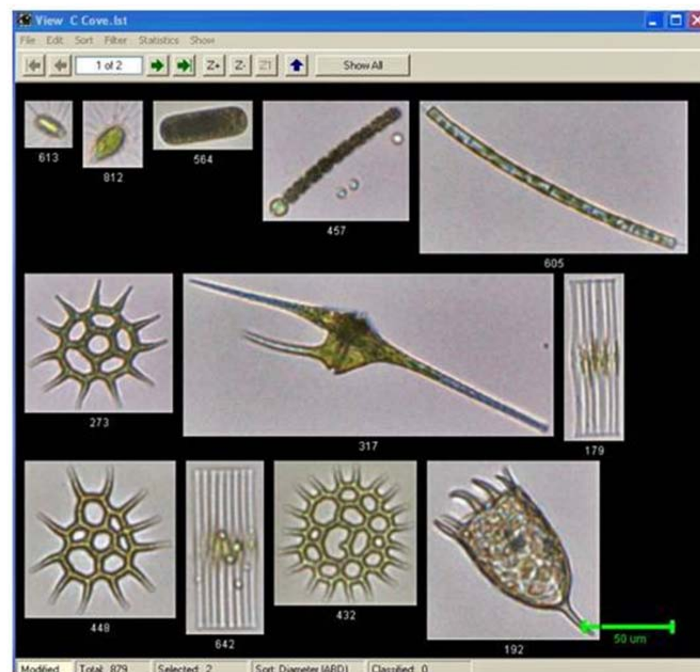


Figure 4.13 Exemple d'images capturées par une *FlowCAM* (*Fluid Imaging Technologies*)

4.7.2.1 Principe de la mesure

Le signal de fluorescence des pigments (Chl-a pour la biomasse totale et phycocyanine pour la biomasse cyanobactérienne) est converti en densité cellulaire ou en biomasse (concentration du pigment), grâce aux relations empiriques établies par le fabricant. La FIV peut être mesurée par des fluorimètres mesurant chaque échantillon individuellement, des fluorimètres en circulation continue, ou des fluorimètres submersibles. Certains appareils sont munis de deux canaux d'excitation/détection conçus pour détecter de façon indépendante la biomasse totale du phytoplancton et des cyanobactéries (par ex. *YSI 6600V2* munis des capteurs *6131* et *6025*; Tableau 4.4). Ce type de fluorimètre estime la densité des cellules de cyanobactéries à partir de l'intensité de fluorescence de la phycocyanine et d'une calibration effectuée sur une souche unicellulaire de biovolume connu (par ex. cultures de *Microcystis*) (Song et al. 2013). Il comporte donc une incertitude significative en milieu naturel pour des cyanobactéries de morphologie différente et en particulier lorsqu'il y a des colonies.

L'autre type de fluorimètre estime la biomasse des cyanobactéries grâce à une excitation séquentielle des pigments impliquant jusqu'à 7 longueurs d'onde (tel que pour le Fluoroprobe; Tableau 4.4.) et une détection de la fluorescence dans le rouge. Le logiciel exploite la signature spectrale des différents groupes spectraux de phytoplancton (cyanobactéries, algues vertes, diatomées + dinoflagellés + chrysophytes, et cryptophytes dans le cas du *Fluoroprobe*) telle qu'obtenues à partir de cultures, et déconvolue le signal multispectral (conversion du signal et correction des effets de bruit) pour donner la biomasse individuelle des groupes et la biomasse totale, en µg Chla mL^{-1} (Beutler et al. 2002). Certains autres fluorimètres (par ex. le *phytoPAM*) peuvent aussi fournir des données physiologiques sur le phytoplancton et les cyanobactéries en plus d'estimer leur biomasse, en utilisant une lumière pulsée.

Différents modèles de sondes FIV sont disponibles sur le marché mais leur prix varie grandement (quelques milliers de dollars à quelques dizaines de milliers de dollars) selon leur niveau de précision et les capteurs complémentaires inclus (profondeur, température, turbidité, oxygène, pH, etc.). D'autres caractéristiques, telles que la longueur du câble (dans le cas des profileurs), l'autonomie de la batterie et la capacité de la mémoire, peuvent aussi influencer significativement leur coût.

Tableau 4.4 Exemples de fluorimètres submersibles fréquemment utilisés

Fluorimètre	Pigments visés	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)	Unité de mesure
YSI 6600V2 (YSI)	Chl-a Phycocyanine	470 590 (±15)	680 660 (±20)	Ratio fluorescence unit (RFU) ou cellules mL^{-1}
MicroFlu-Blue (TriOs)	Phycocyanine	620	655	µg $PC.mL^{-1}$
PhytoPAM (Walz)*	Chl-a	470, 520, 645, 665	> 710	µg $Chl\text{-}a.mL^{-1}$
Fluoroprobe (BBE-Moldaenke)*	Chl-a Phycocyanine	370, 430, 470, 525, 570, 590, 610	680-690	µg $Chl\text{-}a.mL^{-1}$

** Quantification des pigments par déconvolution du signal de fluorescence après excitation aux multiples longueurs d'onde.*

4.7.2.2 Limites de la méthode

La fluorescence est affectée par les caractéristiques morphologiques et physiologiques des espèces présentes (par ex. le stade de développement, la taille des cellules) et par les conditions du milieu (turbidité, présence de macrophytes, interférence par d'autres groupes phytoplanctoniques; Brient et al. 2008). Une calibration et l'ajustement des relations empiriques doivent donc être effectués pour chaque milieu à l'étude afin d'obtenir une plus grande justesse dans l'estimation de la biomasse. Par exemple, deux lacs présents dans la même région d'étude, mais gouvernés par des conditions environnementales différentes (occupation du territoire, régime hydrologique…) ne présenteront pas les mêmes conditions spectrales. Un avantage des sondes submersibles est leur capacité à détecter la présence de picocyanobactéries, non observables au microscope. Cette détection est parfois considérée comme une interférence sur le signal puisque c'est la biomasse des cyanobactéries à potentiel toxique qui est en général la cible des programmes de surveillance. Cependant, des facteurs de correction peuvent être développés, à conditions d'études poussées de la communauté cyanobactérienne par microscopie, cytométrie ou chromatographie. Une connaissance des groupes qui dominent un lac en particulier permet d'être critique envers les estimations provenant de la FIV. De manière générale, la calibration offerte par les fabricants doit être validée pour s'assurer de la justesse des estimés, par exemple par une calibration *a posteriori,* ou par une calibration de la sonde en laboratoire avec des souches plus ressemblantes de la communauté dominante d'un lac donné (Warren 2011).

Si le capteur utilisé ne peut estimer la phycocyanine mais seulement la Chl-a totale (présents dans tous les groupes phytoplanctoniques), le signal de fluorescence peut provenir d'autres groupes d'algues formant aussi des fleurs d'eau (par ex. les chrysophytes). Il est alors recommandé de valider le signal de fluorescence par des observations plus fréquentes au microscope. L'avantage des sondes utilisant des longueurs d'ondes spécifiques de la phycocyanine est que le risque d'erreurs liées aux autres groupes phytoplanctoniques est moindre, elles devraient donc être privilégiées. L'équipe de Michèle Prévost de l'École Polytechnique de Montréal a effectué des tests en laboratoires pour tester l'efficacité de certaines sondes (Zamyadi et al. 2012). Les résultats indiquent que les corrélations entre les lectures des sondes et la densité cellulaire sont très faibles, et qu'une calibration basée sur le biovolume est clairement préférable. Les études ont également démontré que la sonde MicroFlu-blue de TriOS (Figure 4.14) est performante (Brient et al. 2008; McQuaid et al. 2011).



Figure 4.14 Sonde submersible MicroFlu-blue (Trios) et trépied adapté pour des mesures au fond de la colonne d'eau (D. Rolland)

4.7.3 Télédétection

4.7.3.1 Principe général

Des modèles d'estimation de la concentration des pigments phytoplanctoniques par télédétection ont été développés en se basant sur les propriétés optiques (absorption, réflectance, fluorescence) des pigments phytoplanctoniques décrites par la spectroscopie (Randolph 2007; Schalles et Yacobi 2000; Shen et al. 2012). Ainsi, il est possible de discerner la présence de cyanobactéries par leur spectre de réflectance unique lié à leur signature pigmentaire, et ainsi utiliser la télédétection aéroportée ou satellitaire pour cartographier la distribution de la biomasse cyanobactérienne dans un lac (Figure 4.15). Les systèmes de télédétection sont installés sur des satellites (par ex., Dunagan et al. 2009; Kutser, 2004), des bateaux (Leppänen et al. 1995 ; Rantajärvi et al. 1998), ou ils peuvent être aéroportés (Dekker et al. 1992; Jupp et al. 1994; Szekielda et al. 2007; Lekki et al. 2009; Szekielda et al. 2007). Avec la miniaturisation des instruments hyperspectraux, il est maintenant possible d'exploiter les drones (engins télécommandés; unmanned aircraft system) pour faire le suivi des fleurs d'eau (Dunagan et al. 2009). L'avantage d'utiliser des instruments aéroportés qui survolent les plans d'eau de près est que les données receuillies ne nécessitent pas de corrections atmosphériques et ils peuvent obtenir des données sur des lacs de tailles variables.

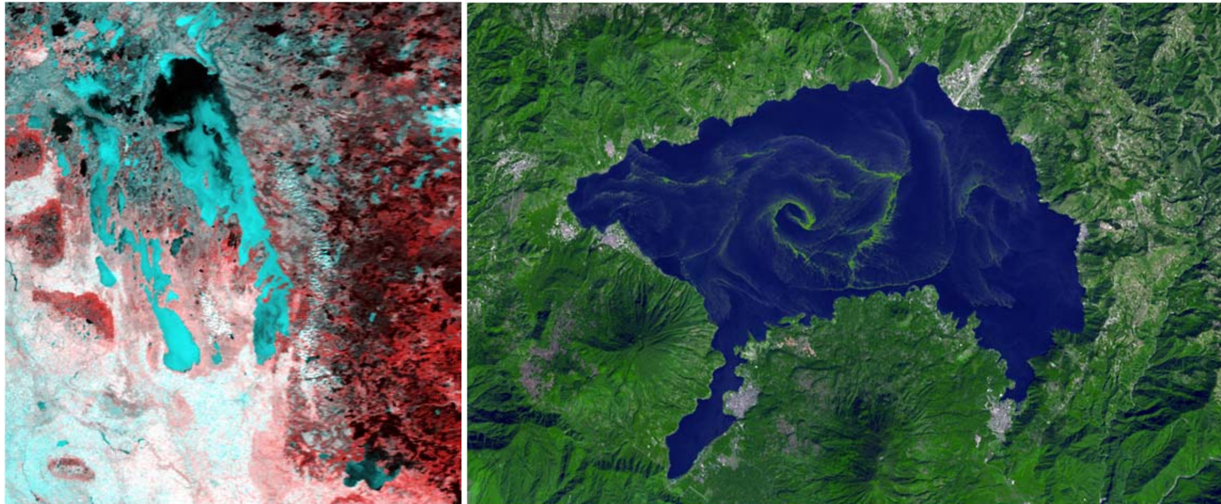


Figure 4.15 (A) Image MODIS du Lac Winnipeg, 24 aout 2008 (tirée de http://www.noetix.on.ca). (B) Image ASTER du Lac Atitlan au Guatémala, 22 novembre 2009 (tirée de http://earthobservatory.nasa.gov).

4.7.3.2 Adaptation aux eaux continentales

On définit les eaux de type 1 comme étant celles dont les propriétés optiques inhérentes sont fonction essentiellement de la concentration en Chl-a, comme c'est le cas des eaux océaniques. Pour les eaux côtières et continentales (eaux de type 2) détenant des concentrations élevées en particules en suspension et en matière organique dissoute colorée, les variations de forme et d'amplitude des spectres d'absorption et de diffusion sont plus complexes (Belzile et al. 2004). Plusieurs algorithmes ont été développés pour étendre l'utilisation de la télédétection à la cartographie de la biomasse phytoplanctonique dans des réservoirs continentaux (Dekker 1993; Schalles et Yacobi 2000; Simis et al. 2005). Aujourd'hui, la robustesse de ces algorithmes pour estimer la Chl-a et la phycocyanine à partir de données spectrales est testée dans divers milieux aquatiques.

Puisque souvent les fortes concentrations en Chl-a sont associées à des efflorescences de cyanobactéries, cet outil peut être exploité pour la surveillance et l'aide à la décision et la planification *a priori* de l'échantillonnage. Le capteur *MERIS* (*Medium Imaging Resolution Spectrometer*) a été ainsi largement utilisé pour délimiter des efflorescences de cyanobactéries (Binding et al. 2011; Kutser et al. 2006; Ruiz-Verdú et al. 2008; Wynne et al. 2008). Cependant, le capteur *MODIS* (*MODerate resolution Imaging Spectroradiometer*), installé à bord des satellites *Terra* et *Aqua*, possède une meilleure résolution spatiale (pouvant atteindre 250 m) et une plus large résolution spectrale (36 bandes allant du visible au PIR) que les capteurs de générations précédentes. Les données de ce capteur sont accessibles gratuitement sur le serveur de la NASA (http://ladsweb.nascom.nasa.gov/) et ont un temps de revisite d'une journée seulement, deux facteurs d'intérêt pour la gestion des fleurs d'eau. Une approche semi-analytique, nommée *APPEL* (*APProche par ÉLimination*) a été développée récemment au Québec (El Alem et al. 2012) et testée sur un ensemble de lacs du Québec méridional, incluant la baie Missisquoi du lac Champlain. L'approche a montré un grand potentiel pour estimer les concentrations en Chl-a avec précision, particulièrement lorsque la biomasse est supérieure à 50 µg Chl-a mL^{-1}.

Le développement d'algorithmes pour l'estimation de la phycocyanine comme indicateur de l'abondance des cyanobactéries est récent, par exemple, l'algorithme semi-empirique de Simis et al. (2005) montre des résultats prometteurs. Les diverses sources d'erreurs doivent cependant être investiguées pour rendre l'algorithme plus robuste et pouvoir le généraliser à tous les réservoirs turbides et eutrophes (Randolph et al. 2008). Notamment, la distribution verticale de la biomasse de cyanobactéries dans la colonne d'eau a un impact important sur l'amplitude et la forme du spectre de

réflectance. Il est donc nécessaire d'acquérir encore des connaissances détaillées sur la distribution verticale des cyanobactéries afin d'améliorer les algorithmes existants (Kutser et al. 2006).

Par ailleurs, il est possible d'entrevoir une adaptation de ces algorithmes aux conditions environnementales, par exemple, en fonction de la saison d'étude (Metsamaa et al. 2006), et une amélioration de la séparation des groupes phytoplanctoniques selon leur composition pigmentaire (par ex. la fucoxanthine pour les diatomées, la Chl-b pour les algues vertes et les prochlorophycées, l'alloxanthine pour les cryptophycées, la péridine pour les dinoflagellées, et la phycocyanine, phycoerythrine et zéaxanthine pour les cyanobactéries; Simis et al. 2006). Certains espèrent même en venir à séparer les cyanobactéries nocives des cyanobactéries non nocives à l'aide de la télédétection (Lavender et al. 2001).

4.7.3.3 Avantages de la télédétection

La télédétection présente l'avantage de fournir une large couverture de la distribution spatiotemporelle du phytoplancton (Simis et al. 2005). Bien que son utilisation ne puisse remplacer la précision des analyses en laboratoire d'échantillons d'eau (par microscopie et dosage de la Chl-a ou de la phycocyanine), la télédétection offre une approche complémentaire pour la surveillance des eaux continentales. L'imagerie multi-spectrale de haute résolution devrait bientôt permettre d'améliorer la représentation spatiale des cyanobactéries en milieu lacustre (Hunter et al. 2010). La mise en orbite de nouveaux capteurs satellitaires avec des capacités améliorées (Landsat-8 lancé avec succès en 2013; Sentinel-2A et -2B dont les lancements sont respectivement prévus pour 2014 et 2015) ouvrent la porte au développement d'outils permettant de cartographier la qualité des eaux douces de manière systématique avec une haute résolution spatiale (10-30 m), et à une fréquence d'observation hebdomadaire, voire journalière. Cette recherche en pleine expansion permettra de suivre en temps réel la plupart des milieux lacustres du Québec. Ainsi, les données satellitaires pourraient apporter une grande aide aux gestionnaires de l'eau pour détecter en temps quasi-réel le développement des fleurs d'eau. Ces données permettraient de planifier *a priori* les missions de terrain en fonction du niveau de détérioration et de l'importance des plans d'eau touchés, de minimiser les coûts alloués aux déplacements, et de suivre simultanément dans un minimum de temps un ensemble de lacs sur un territoire aussi large que le Québec méridional.

4.7.3.4 Inconvénients de la télédétection

La télédétection permet d'obtenir des informations rigoureuses sur l'étendue des efflorescences de cyanobactéries. Cependant, la plupart des modèles ont été développés pour estimer la biomasse totale (c.-à-d. la Chl-a; fonctionne pour détecter cyanobactéries quand celles-ci dominent) et non la phycocyanine, étant donné la résolution spectrale et spatiale des capteurs disponibles jusqu'à récemment (optimisés pour les phénomènes terrestres ou les eaux salées de type 1; Ahn et al. 2006; Becker et al. 2009; ElAlem et al. 2012; Gitelson et al. 2007).

Une grande limite de la télédétection satellitaire est liée à la présence de nuages qui rendent les images inexploitables. En contrepartie, comme l'ensoleillement figure parmi les conditions qui stimulent le développement des fleurs d'eau, l'utilisation de la télédétection n'est peut-être pas tant restreinte par ce problème. Les difficultés logistiques de la collection et du traitement des images provenant de capteurs aéroportés ou satellitaires, ainsi que leur résolution spectrale et spatiale tendent à rendre cet outil encore difficile d'accès pour les gestionnaires de plans d'eau. Randolph et al. (2008) suggèrent l'utilisation de capteurs portatifs installés sur le terrain pour la surveillance des lacs, évitant ainsi toute la problématique des corrections atmosphériques. Cette approche doit tout de même encore faire ses preuves et bien entendu ne possède pas la couverture spatiale des images satellitaires.

5 Détection et quantification des cyanotoxines

Au niveau international, il existe une gamme très étendue de méthodes analytiques utilisées dans les laboratoires afin de détecter, identifier et quantifier les cyanotoxines produites par les cyanobactéries en cas d'efflorescences (Srivastava et al. 2013). Le schéma général suivi par les différentes méthodes d'analyse en utilisation dans les laboratoires est présenté à la Figure 5.1.

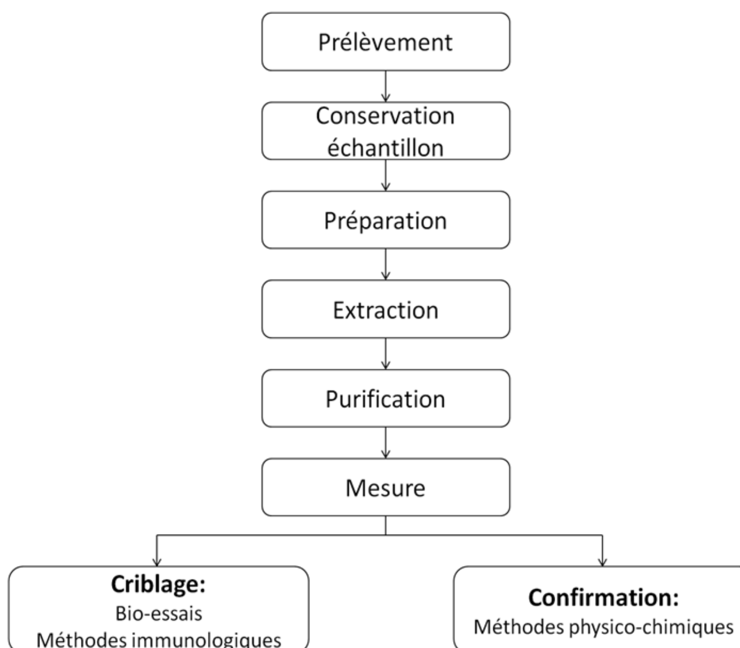


Figure 5.1 Stratégie analytique suivie par les laboratoires au niveau international pour l'analyse des cyanotoxines dans les eaux récréatives et les eaux de consommation

5.1 Stockage et conservation des échantillons

5.1.1 Contenants

Afin de détecter, d'identifier et de quantifier les cyanotoxines, les échantillons d'eau brute (eau récréative ou eau de consommation) peuvent être conservés dans des bouteilles en plastique (polyéthylène), en Téflon ou en verre d'une capacité de 1 ou 2 L fermées avec un couvercle hermétique. De manière générale, les contenants en verre sont préférables pour l'échantillonnage des eaux brutes contenant des cyanotoxines. Cependant, des bouteilles en polyéthylène d'une capacité de 1 L peuvent être utilisées (Swanepoel et al. 2008). Afin de prévenir tout risque de dégradation photochimique des

cyanotoxines, il est fortement recommandé de conserver les échantillons dans des contenants ambrés qui sont ensuite conservés dans un endroit sombre (Graham et al. 2008; Swanepoel et al. 2008).

5.1.2 Modes de conservation

Immédiatement après l'échantillonnage, les échantillons d'eau brute doivent être placés sur de la glace sèche ou sur des paquets de glace dans une glacière à une température inférieure à 10°C afin d'éviter tout risque de dégradation des cyanotoxines (Kasich et al. 2012; Swanepoel et al. 2008). Lors de la réception des échantillons au laboratoire, ces derniers doivent être inspectés individuellement (échantillon fermé hermétiquement, contenant non endommagé, contrôle de la température) afin de s'assurer que les conditions de stockage n'ont pas été compromises lors du transport (Swanepoel et al. 2008). Après réception des échantillons au laboratoire, ces derniers peuvent être conservés à 4 ± 3°C si l'analyse peut être réalisée dans les 24 à 48 h, immergés dans l'azote liquide ou congelés à –20°C si l'analyse ne peut être réalisée dans les 24 à 48 h (Graham et al. 2008). Les échantillons préservés dans l'azote liquide à -20°C peuvent être conservés dans des tubes en polypropylène d'une capacité de 50 mL (Swanepoel et al. 2008).

Afin d'éviter tout risque de dégradation des cyanotoxines dans le temps, il est fortement recommandé de réaliser les étapes de préparation des échantillons (lyse cellulaire, purification, concentration) dans les 7 jours suivants l'échantillonnage et de détecter et/ou quantifier les cyanotoxines présentes dans l'échantillon d'eau brute dans les 40 jours suivants l'échantillonnage. Les temps maximum de conservation des échantillons d'eau dépendent majoritairement du type de cyanotoxines analysées. En effet, pour l'analyse des **microcystines**, il est préconisé de conserver les échantillons d'eau brute à 4 ± 3°C et il est fortement déconseillé de les conserver plus de 48 h (ISO 20 179 2005), alors que pour l'analyse de l'**anatoxine-a**, il est fortement recommandé de réaliser l'analyse dans les plus brefs délais car l'anatoxine-a est un composé peu stable (James et al. 1998). Pour l'analyse des **saxitoxines**, les échantillons peuvent être conservés quelques semaines à 3-4°C (AOAC 959.08 2010), cependant des transformations ou dégradations de certaines saxitoxines sont à prévoir avec l'âge de l'échantillon et le stockage (Negri et al. 1997) pouvant avoir une influence sur la toxicité totale de l'échantillon.

D'après l'enquête réalisée, certains laboratoires préconisent de congeler les échantillons et ce, quelque soit le temps écoulé entre la réception de l'échantillon et l'analyse des cyanotoxines, afin d'assurer leur bonne conservation. Cependant, la congélation des échantillons peut entraîner un « *relargage* » des toxines intracellulaires dans l'échantillon. Dans le cas où l'échantillon entier est congelé, seule la quantité de toxines totales (intra- + extra-cellulaires) peut être déterminée. De manière générale, il est préférable, voire recommandé, de filtrer l'échantillon dès son arrivée au laboratoire et de congeler séparément le filtrat et le filtre pour permettre la quantification à la fois des toxines intracellulaires, retenues sur le filtre et des toxines extracellulaires présentes dans le filtrat (Chorus et Bartram 1999). Les méthodes de séparation des fractions solide et liquide utilisées en laboratoire sont présentées dans la section « *4.2 Préparation des échantillons* ». Dans le cas où la détermination de la concentration totale en cyanotoxines est réalisée sans différenciation des toxines intra- ou extra-cellulaires, les échantillons peuvent être congelés sans filtration. Pour les échantillons d'eau de consommation contenant du chlore (> 0,1 $mg.L^{-1}$), une étape de déchlorination par ajout de thiosulfate de sodium (0,008%) est recommandée avant de conserver les échantillons au réfrigérateur ou au congélateur (Swanepoel et al. 2008).

5.2 Préparation des échantillons

La préparation des échantillons comprend plusieurs étapes: une étape de **séparation**, indispensable pour distinguer les cyanotoxines intracellulaires liées à la fraction solide (cellules cyanobactériennes) et les cyanotoxines extracellulaires (dissoutes dans l'eau), une étape de **lyse cellulaire** puis d'extraction pour briser les parois cellulaires des bactéries et favoriser la solubilisation des toxines intracellulaires, ainsi qu'une étape de **purification** (optionnelle en fonction de la méthode de dosage). La Figure 5.2 présente le schéma général des différentes étapes de préparation d'un échantillon d'eau brute réalisées en laboratoire. Les étapes d'extraction et de lyse cellulaire par congélation-décongélation et/ou congélation-séchage (lyophilisation) et/ou ultrasonication peuvent être réalisées plusieurs fois afin d'améliorer le taux de récupération des cyanotoxines. De manière générale, les étapes d'extraction et de lyse cellulaire sont répétées de 1 à 3 fois afin d'optimiser la récupération des cyanotoxines.

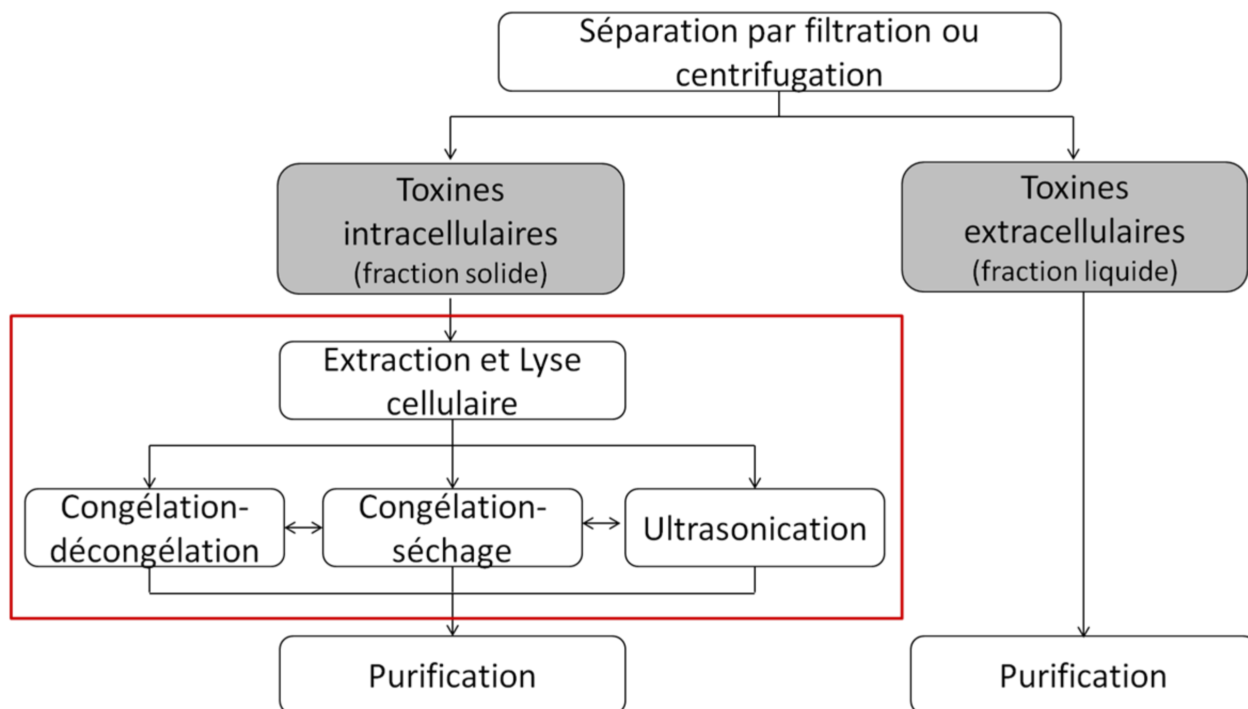


Figure 5.2 **Stratégie analytique utilisée par les laboratoires pour la préparation des échantillons d'eau brute en vue de la détection, l'identification et la quantification des cyanotoxines**

5.2.1 Séparation des fractions solide et liquide

L'étape de séparation des fractions solide et liquide s'avère très importante afin de quantifier séparément les toxines extracellulaires (dissoutes dans l'eau) et les toxines intracellulaires (biomasse algale). Cette étape de séparation peut se faire par filtration ou centrifugation. La séparation des fractions solide et liquide par centrifugation est peu utilisée en laboratoire, en raison du faible volume des tubes de centrifugation comparativement au volume de l'échantillon d'eau brute à analyser. Cependant, pour la détection et la quantification de la BMAA intracellulaire, Esterhuizer et Downing (2009) préconisent une séparation solide/liquide par centrifugation à 15 800 x *g* pendant 10 min à 4°C. En général, la séparation des fractions solide et liquide est majoritairement réalisée par filtration à l'aide de filtres en microfibres de verre dont la porosité doit être comprise entre 1 et 2 µm (ISO 20 179, 2005). Dans le cadre de cette étude, les laboratoires interrogés procèdent à une étape de séparation par filtration sur filtre de type « *Glass Microfibre Binder Free Grade GF/C* » (porosité de 1,2 µm) ou « *Glass Microfibre Binder Free Grade GF/F* » (porosité de 0,7 µm) provenant du fournisseur Whatman ou de

filtre Millipore (porosité de 0,45 µm). Parmi les 79 laboratoires ayant répondu à notre enquête et réalisant l'analyse des cyanotoxines dans les eaux récréatives et/ou dans les eaux de consommation, 19 réalisent une étape de séparation solide/liquide par filtration. Aucun des laboratoires interrogés n'utilise la centrifugation pour séparer la biomasse algale de l'échantillon d'eau brute (Tableau 5.1). Différentes procédures opératoires standards ont été établies afin de permettre aux laboratoires d'analyse à travers le monde de réaliser adéquatement cette étape primordiale de séparation des fractions solide et liquide.

Au niveau International, la norme ISO 20179 (2005) spécifie les différentes étapes décrites ci-dessous pour la séparation des fractions solide et liquide et l'analyse des microcystines présentes dans les eaux brutes. Les étapes de séparation des fractions solide/liquide sont les suivantes:

- Filtrer entre 50 et 100 mL d'échantillon à travers un filtre en microfibre de verre dont la porosité doit être comprise entre 1 et 2 µm pour séparer la biomasse algale de la fraction liquide. Si des algues flottantes sont présentes dans l'eau brute, un seul filtre peut s'avérer insuffisant pour la filtration de 50 à 100 mL d'échantillon. Dans ce cas, remplacer le filtre colmaté par un nouveau filtre.

Au niveau Européen, le protocole opératoire standard établi par Metcaff et Codd (2005a) (SOP_TOXIC_UDU_02F) préconise les étapes suivantes pour favoriser la séparation des fractions solide et liquide et, conséquemment, la détermination des toxines intracellulaires et extracellulaires:

- Positionner un filtre en microfibre de verre de type GF/C dans une boîte de Pétri identifiée avec le nom de l'échantillon dans le four à 80°C pendant 24 h minimum;
- Déterminer le poids du filtre à 0,1 mg près et noter la masse du filtre sec sur la boîte de Pétri pour éviter tout risque de confusion;
- Mesurer 1 L d'échantillon d'eau brute homogénéisé à l'aide d'un cylindre gradué;
- Préparer le système de filtration sous vide et filtrer 1 L d'échantillon à travers le filtre GF/C préalablement séché et pesé. Si l'échantillon contient une biomasse algale importante, filtrer 250 mL ou 100 mL au lieu de 1 L afin d'éviter le colmatage du filtre;
- Récupérer le filtrat et le placer dans une bouteille de 1 L en verre ambré et le conserver pour l'analyse des cyanotoxines extracellulaires;

- Placer le filtre dans la boîte de Pétri identifiée et conserver le tout au congélateur à -20°C jusqu'à l'analyse des microcystines, de la cylindrospermopsine ou des anatoxines.

En Afrique du Sud, un manuel regroupant les méthodes standard d'échantillonnage, de détection et d'identification et de quantification des cyanobactéries et des cyanotoxines (microcystines, anatoxine-a et cylindrospermopsine) a été établi par Swanepoel et al. (2008). Les étapes de filtration recommandées par ce manuel sont similaires à celles définies au niveau international par la norme ISO 20179 (2005).

Selon Chorus et Bartram (1999), il est recommandé de sécher le filtre GF/C après filtration dans le four à 45°C (la température du four doit impérativement être inférieure à 50°C). Le filtre sec doit ensuite être positionné dans un dessiccateur, puis pesé à 0,1 mg près afin de calculer la masse de cellules par soustraction des masses des filtres secs avant et après filtration. Les cyanotoxines peuvent être extraites du filtre puis dosées immédiatement ou le filtre peut être conservé, préférentiellement au congélateur à -20°C. En suivant cette procédure, il est possible de calculer la concentration en cyanotoxines intracellulaires et extracellulaires en fonction de la masse sèche de cyanobactéries ou du volume d'échantillon filtré. Quelques fois, la biomasse algale peut être affectée par la présence de larges particules (phytoplancton, détritus, etc.). Une brève vérification au microscope permet de déterminer si la présence de phytoplancton ou de détritus peut s'avérer problématique. Afin de ne pas surestimer la biomasse cyanobactérienne, une pré-filtration sur des filtres dont la porosité est comprise entre 1 et 2 µm peut être réalisée. La Figure 5.3 récapitule les différentes étapes recommandées par Chorus et Bartram (1999) pour assurer une séparation solide/liquide efficace et de qualité.

Tableau 5.1 Récapitulatif des modes de conservation et/ou de séparation solide/liquide utilisés dans les laboratoires contactés afin de permettre l'analyse des cyanotoxines (d'après les réponses aux questionnaires)

Pays	Code Laboratoire	Toxines analysées	Conservation échantillon
Afrique du Sud	1	Mycrocystines (MCs)	n.c.*
Allemagne	2	MC-LR, MC-RR et MC-YR	Filtration puis congélation des échantillons
Argentine	3	MC-LR, MC-RR, MR-YR, MC-LA, Nodulraines (NODs), Anatoxine-a (ATX-a)	Filtration d'1 L d'échantillon sur filtre 0,45 µm (Millipore) puis séchage des filtres et conservation dans des feuilles d'aluminium à -20°C. Conservation des filtrats dans des bouteilles en verre foncée au congélateur à -20°C
Australie	7	MCs, ATX-a, Cylindrospermopsine (CYL), Deoxycylindrospermopsine, Saxitoxine (STX)	Analyse des toxines dans les 3 jours suivant l'échantillonnage sinon conservation des échantillons à -20°C dans des bouteilles en plastique - Pas d'ajout d'agent de préservation
Australie	8	MCs, NODs, ATX-a, STX, CYL	Échantillonnage de 1 L d'eau brute dans des bouteilles en plastique HDPE ou en verre transportée puis conservée à 4°C
Autriche	10	MC-LR, MC-RR, MC-YR	n.c.
Brésil	11	MCs, STX, CYL	n.c.
Bulgarie	12	MCs, STX	n.c.
Canada	13	MC-HilR, MC-HtyR, MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LR(D-Asp3), MC-LW, MC-LY, MC-RR, MC-RR (D-Aps3), MC-WR, MC-YR, ATX-a	Filtration sur 1,2 µm puis conservation de l'extrait à 4°C si analyse dans les 7 jours ou à – 20°C si délai d'analyse supérieure à 7 jours. Conservation des filtres à -20°C
Canada	16	MC-LR, MC-RR, MC-YR, ATX-a	n.c.
Canada	17	MC-LR,MC-LA, MC-LY,MC-LW,MC-RR, BMAA	Vials en plastique puis congelation des échantillons à -20°C
Canada	18	MCs, ATX-a, CYL, STX	n.c.
Danemark	19	MC-LR, MC-RR, MC-YR, DM-MC-LR, DM-MC-RR, MC-LF, MC-MW, MC-LY, NODs	Filtration puis congélation dans l'azote liquide
Espagne	20	MCs, ATX-a, STX, CYL	Filtration des échantillons sur filtres GF/F (0,7 µm) puis conservation des filtres à -20°C jusqu'à l'analyse et du filtrat à 4°C

Pays	Code Laboratoire	Toxines analysées	Conservation échantillon
Espagne	21	MCs; ATX-a; STX; CYL	Aucun ajout d'agent de préservation - Congélation rapide après filtration sur filtre GF/F Whatman
Estonie	23	MCs	n.c.
Finlande	24	MC-LR, STX, NOD-R, GTX2 et GTX3	Filtration sur filtre GF/C puis congélation des échantillons
France	26	MC-LR, MC-YR, MC-RR	n.c.
France	27	MC-LR, MC-YR, MC-RR, ATX-a, CYL, STX, NODs	Idéalement, pas de conservateur. Les échantillons sont stockés en glacière mais non refroidis pour éviter les chocs thermiques et rester au plus près des températures sur site. Les échantillons sont ensuite conservés à 4°C jusqu'à l'analyse (maximum 48 h).
France	28	MCs, ATX-a, STX, CYL	Ajout de Lugol et Formol 10% (v/v) - Conservation 2 jours
France	29	MC-LR, MC-YR, MC-RR, NODs, ATX, STX, CYL	n.c.
France	30	MCs	Conservation de l'échantillon moins d'une semaine au congélateur à -80°C
France	31	MCs	Filtration de 300 mL d'échantillon sur filtre en fibre de verre GF/C (Whatmann). Conservation de l'échantillon de 1 semaine à 1 mois à l'abri de la lumière dans du formol (5%) neutralisé au Borax et au Lugol
France	32	MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LF, MC-LW, NODs	Flacons plastique d'1 L (ou 0,5 L). Conservation au frais et à l'obscurité de l'échantillon brut
France	33	MCs	n.c.
France	34	MCs	Filtration des échantillons sur filtre en fibres de verre de type GF/C
France	35	MCs dans les poissons: MC_LR, MC-RR, MC-LF, MC-LW , MC-YR et NOD et STX dans les coquillages	n.c.
France	36	MCs	Filtration
France	37	MCs : LR,RR,YR,LA,LW,LF,LY, NODs, STX, ATX-a, CYL	Filtration sur fibre de verre de 1,2 µm. Conservation des échantillons entre 2 et 8°C et analyse dans les 24 h
Grèce	43	MCs, NODs, ATX-a, CYL, BMAA	Réfrigération des échantillons dans des bouteilles en verre de 1 à 2, L

Pays	Code Laboratoire	Toxines analysées	Conservation échantillon
Grèce	44	MC-LR,MC-RR, CYL	Contenant de 1 L (volume minimum) en verre de préférence
Grèce	45	MCs, CYL	Filtration sur filtre GF/C puis congélation des échantillons
Hongrie	46	MC-LR, MC-RR, MC-YR	Ajustement du pH (si nécessaire) entre 5 et 8 par ajout de TFA ou d'hydroxide d'ammonium. Filtration sur filtre (porosité: 0,45 µm)
Inde	47	MCs	Conservation maximale des échantillons pendant 24 h après lyophilization dans des vials cryogéniques
Israël	48	MCs, CYL	Conservation des échantillons entre 24 h et 1 semaine
Italie	49	MC-RR, MC-RRdm,MC-LR,MC-LRdm,MC-YR, MC-LF, MC-WR,MC-LA,MC-LW, ATX-a, CYL	Filtration sur filtre GF/C puis congélation des échantillons
Japon	50	MC-RR, MC-LR,MC-WR, MC-FR, 7dmMC-LR, ATX-a, CYL	n.c.
Luxembourg	52	STX	Réfrigération des échantillons à 4°C dans le noir. Conservation maximale des échantillons: 15 jours
Macédoine	53	MC-LR, MC-LF, MC-LW, MC-RR, MC-YR, ATX-a	n.c.
Namibie	54	MCs	Les échantillons sont analysés dès que possible ou dans les 24 h suivant la réception de l'échantillon. Aucun ajout de conservation dans l'échantillon avant analyse
Norvège	55	MCs, CYL; STX	Conservation des échantillons dans des bouteilles brunes
Nouvelle-Zélande	56	MCs/NODs, ATX-a, Homo-anatoxine, CYL, STX	n.c.
Nouvelle-Zélande	59	MCs, STX, NODs	n.c.
Pays-Bas	61	MC-LR, MC-RR, MC-YR, Nodularines	< 24 h
Pays-Bas	62	dm-7-MC-RR, MC-RR, MC-YR, dm-7-MC-LR, MC-LR, MC-LY, MC-LW, MC-LF, ATX-a, Homoanatoxine-a, Saxitoxine, CYL, Deoxycylindrospermosine, 7-epi-cylindrospermosine, NOD, Gonyautoxines, BMAA	Conservation des échantillons à -20°C
Pologne	63	MCs	n.c.
Pologne	64	MCs	Filtration des échantillons sur filtre GF/C puis congélation du filtre et du filtrat

Pays	Code Laboratoire	Toxines analysées	Conservation échantillon
Pologne	65	(dm) MC-RR, (dm) MC-LR, MC-YR, MC-LA, MC-LY, NODs, ATX-a, CYL, STX, BMAA	n.c.
Portugal	66	MCs, ATX-a, CYL	n.c.
République Tchèque	67	MCs, CYL	n.c.
Royaume-Uni	68	MCs	Conservation des échantillons à 4°C ou filtration de 1 L de chaque échantillon sur filtre GF/C préalablement séché à 80°C puis conservation du filtrat à 4°C et du filtre à -20°C
Slovaquie	69	MC-LR, MC-YR, MC-RR, MC-Seco3 RR	n.c.
Slovénie	70	MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LA, MC-LW, MC-LF, CYL, STX	n.c.
Sri Lanka	71	MCs, CYL	Filtration sur filtre GF/C. Conservation des échantillons dans des bouteilles brunes et analyse dans les 24 h
Suéde	72	BMAA	Conservation des échantillons à -20°C
Suisse	73	MC-LR, MC-RR, MC-YR,	n.c.
Suisse	74	MC-RR,• [D-Asp3, E-Dhb7] - MC RR, MC-LR, MC-YR	n.c.
Taïwan	75	MC-LR, MC-RR, Anatoxine-a	n.c.
Taïwan	76	MC-R, MC-RR, MC-YR,MC-LF, MC-LW	n.c.
Turquie	77	MCs, NODs, ATX-a, CYL	n.c.
USA	79	MC-LR, MC-LA,MC-YR,MC-RR, NODs, ATX-a, CYL	40 mL d'échantillon conservés dans des bouteilles ambrées
USA	80	MC-LR, MC-YR, MC-RR, NODs, ATX-a, CYL	n.c.
USA	81	MCs, NODs, ATX-a, CYL, STX	n.c.
USA	82	MCs, ATX, CYL, STX, BMAA, Lyngbyatoxine, Aplysiatoxine	n.c.
USA	83	MC-LR, ATX-a, STX, CYL	n.c.
USA	84	MCs, NODs, ATX-a, STX, CYL, Lyngbyatoxine	Conservation des échantillons dans des bouteilles en plastique au congélateur. Remarque: si analyse des CT totales, ne remplir la bouteille qu'à moitié pour éviter de rompre les parois cellulaires

Pays	Code Laboratoire	Toxines analysées	Conservation échantillon
USA	85	MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LA, ATX-a, Homoanatoxine-a, Saxitoxine, CYL, Déoxycylindrospermopsine	Conservation des échantillons dans des bouteilles ambrées d'une capacité de 1L puis congélation des échantillons dès leur réception. Analyse de l'échantillon dans les 2-3 jours.
USA	86	MCs, STX, CYL	n.c.
USA	87	MCs	n.c.
USA	88	MC-LR, MC-LF, MC-RR, ATX-a, CYL	Conservation des échantillons à 4°C dans des bouteilles en verre borosilicatées
USA	89	MCs, ATX-a, STX, CYL	n.c.
USA	90	MCs dont MC-RR, MC-YR, MC-LR et MC-LF pour analyse HPLC, ATX-a, STX, CYL	n.c.
USA	91	MCs, ATX-a	Conservation des échantillons dans des bouteilles en verre à 4°C ou à -20°C si t> 48h
USA	92	MCs, CYL	Filtration des échantillons sur 1,5 µm (Filtre en fibre de verre ProWeigh) et 63 µm puis conservation des échantillons dans des bouteilles en HPDE ambrées à -20°C
USA	93	MCs, ATX-a, Homoanatoxine, STX, Néosaxitoxine, CYL	Conservation des échantillons à 4°C et préparation des échantillons le plus tôt possible. Pas de congélation des échantillons tant que les étapes de filtration n'ont pas été réalisées. Filtration sur filtre GF/C.
USA	94	MC-LR, MC-RR, MC-LA, MC-LY, ATX-a	Filtration de l'échantillon à travers un filtre GF/C
USA	95	MCs et NODs	Conservation des échantillons dans des bouteilles en verre de 1 L sur la glace
USA	96	MCs	Pas d'ajout d'agent de préservation et conserver dans une glassière durant le transport jusqu'au laboratoire

**n.c. : non communiqué*

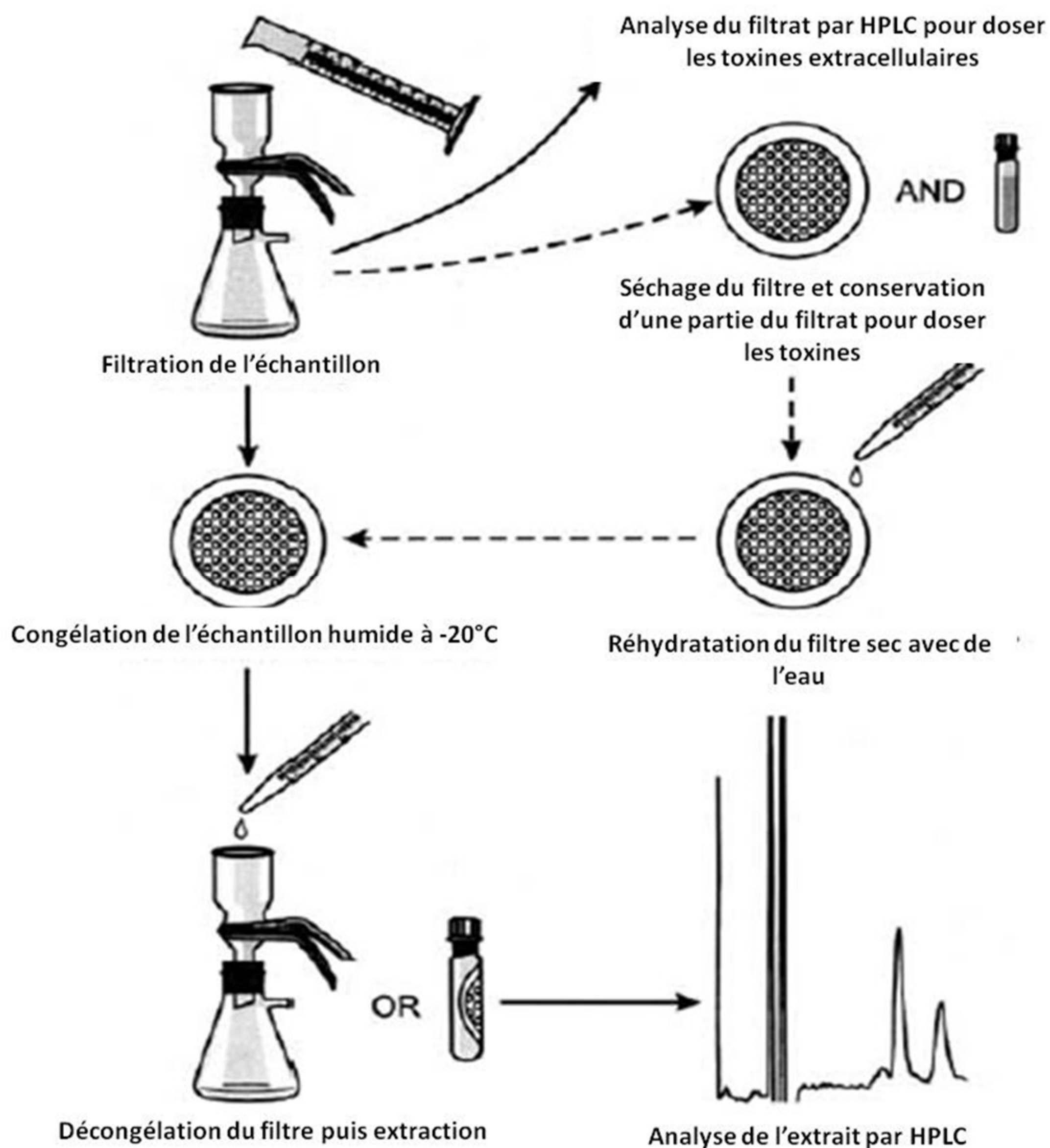


Figure 5.3 **Schéma récapitulatif des différentes étapes de séparation solide/liquide recommandées par Chorus et Bartram (1999) pour la détection, l'identification et la quantification des cyanotoxines intra- et extra-cellulaires**

5.2.2 Extraction et lyse cellulaire pour l'analyse des toxines intracellulaires

L'étape de récupération des toxines intracellulaires est primordiale afin d'évaluer adéquatement la concentration en toxines totales en dissociant les toxines intracellulaires des toxines extracellulaires. Les toxines peuvent être relâchées dans l'eau lors de la mort cellulaire des cyanobactéries ou lors de leur

division. En général, les toxines intra-cellulaires représentent 80% des toxines présentes dans un échantillon d'eau brute, alors que dans le cas des cylindrospermopsines, les toxines sont majoritairement présentes sous forme extracellulaire (Meriluoto et Codd 2005).

Une mauvaise récupération des cyanotoxines intracellulaires peut entraîner une sous-estimation des cyanotoxines totales, ce qui peut avoir des conséquences importantes sur la gestion des eaux récréatives et des eaux de consommation. Différents solvants ont été étudiés au cours des dernières années afin d'évaluer leur performance à solubiliser les diverses toxines présentes dans la biomasse algale obtenue par séparation solide/liquide. Les solvants ou solutions les plus utilisés sont: l'acide acétique, l'acide chlorhydrique, le MeOH, le dichlorométhane, un mélange d'eau et de MeOH acidifié par ajout d'acide trifluoro-acétique (TFA) ou non. Le choix d'un solvant acidifié permet de limiter la co-extraction des protéines cellulaires. L'efficacité de l'étape de solubilisation dépend principalement du type de solvant utilisé et est fonction de la cyanotoxine ciblée (Tableau 5.2).

Tableau 5.2 Exemples de solvants utilisés pour l'extraction de cyanotoxines

Cyanotoxines	**Solvant utilisé**	**Sources**
Anatoxine-a	Milieux aqueux acidifié ou non (0,05 M acide acétique par exemple) MeOH/eau MeOH/eau 75/25 acidifié par HCl (0,2 M) Chloroforme puis HCl Dichlorométhane après une étape d'acidification et de neutralisation	Afssa et Afsset (2006) Chorus et Bartram (1999) Rawn et al. (2005)
Cylindrospermopsines	MeOH pur + acide acétique (5%)	Afssa et Afsset (2006)
Microcystines	Acide acétique (5%) Mélange MeOH/eau MeOH/eau/n-butanol (20/75/5)	Afssa et Afsset (2006); ISO 20179 (2005)
Nodularines	MeOH/eau	Afssa et Afsset (2006)
Saxitoxines	Acide acétique Solution acide (pH = 3) avec 25% MeOH Acide chlorhydrique	Afssa et Afsset (2006) AOAC 959.08 (2010)

Quelque soit l'efficacité des étapes d'extraction, la récupération complète des toxines intracellulaires ne peut être envisagée sans la rupture des parois cellulaires des cyanobactéries. Différentes techniques de lyse cellulaire (ébullition, autoclave, congélation-séchage ou lyophilisation, congélation-décongélation,

ultrasonication) ont été mises en place afin de rompre les parois cellulaires des cyanobactéries favorisant la libération des toxines intracellulaires.

Une étude a été réalisée par USGS (2010-1289) afin de comparer cinq différentes techniques de lyse cellulaire et de déterminer la plus efficace (Rosen et al. 2010). Parmi les techniques étudiées, on retrouve :

- L'ébullition : 50 mL d'échantillon contenu dans des bouteilles brunes portés à ébullition;
- L'autoclave : 50 mL d'échantillon contenu dans des bouteilles brunes autoclavés pendant 5, 10 ou 30 min à 120°C à P = 2,03 kPa;
- La sonication : 15 mL d'échantillon contenu dans des bouteilles brunes soniqués sur glace pendant 5 min avec une force variant de 10 à 70% (T < 25°C); nettoyage de la sonde avec MeOH, puis MeOH contenant 0,1% de tétrahydrofurane, puis eau;
- *QuickLyse™* (se référer aux instructions fournies dans le kit *Abraxis®*);
- Cycle de congélation-décongélation : congélation de l'échantillon pendant 24 h, puis décongélation à température ambiante pendant 12 h.

Parmi les techniques de lyse cellulaire étudiée par USGS (2010-1289), la sonication avec un pouvoir de lyse à 70% est la technique la plus efficace. Les essais réalisés avec différentes forces de sonication indiquent qu'une augmentation de la puissance entraîne une amélioration de la lyse cellulaire et se traduit par une augmentation de la quantité de cellules extraites. Le kit *QuickLyse™* d'*Abraxis®*, quant-à-lui, semble être la technique de lyse cellulaire la moins efficace (Rosen et al. 2010). Toutefois, dans l'étude comparative menée par USGS (2008), les résultats indiquent que le kit *QuickLyse™* permet d'obtenir la même efficacité de lyse cellulaire que trois cycles de congélation-décongélation, technique largement utilisée par les laboratoires à travers le monde (Loftin et al. 2008). Selon Kasich et al. (2012), l'ultra-sonication est une technique de lyse cellulaire efficace. Cependant, des précautions doivent être prises afin d'empêcher toute perte de toxines due à une élévation de la température de l'échantillon. Les auteurs préconisent de réaliser les étapes de sonication sur glace ou dans un bain d'eau froide afin de prévenir une trop grande élévation de température.

5.2.2.1 Anatoxine-a

À ce jour, il n'existe aucun protocole international (norme ISO) pour la préparation et le dosage de l'anatoxine-a, de l'anatoxine-a(S) ou de l'homo-anatoxine.

Au niveau Européen, le protocole opératoire standard établi par Meriluoto et Spoof (2005a) (SOP_TOXIC_UDU_06F) préconise les étapes suivantes pour favoriser la récupération de l'anatoxine-a intracellulaire:

- Sortir la boîte de Pétri contenant le filtre du congélateur et le placer dans l'unité de lyophilisateur jusqu'à ce que le filtre soit sec (24 à 48 h);
- Placer le filtre sec dans un contenant en verre borosilicaté et ajouter 1,2 mL de MeOH pur (100%), homogénéiser et extraire à l'aide d'un bain à ultrasons pendant 15 min. Les filtres ayant un diamètre supérieur à 47 mm doivent être extraits avec 2 mL de la solution de MeOH à 75%. Les tubes doivent être couverts à l'aide de parafilm lors de l'étape de sonication;
- Ultrasoniquer pendant une minute l'échantillon à l'aide d'un sonicateur équipé d'une sonde micro-pointe. Laver la sonde avec une solution de MeOH à 100% entre chaque échantillon pour éviter tout risque de contamination. Durant la sonication, conserver l'échantillon sur la glace afin d'éviter toute augmentation excessive de la température à l'intérieur de l'échantillon;
- Centrifuger l'échantillon à 4 000 min^{-1} pendant 10 min;
- Transférer 500 µL du surnageant dans un tube en verre borosilicaté et évaporer à sec dans un bloc chauffant à 50°C sous une atmosphère d'argon;
- Récupérer l'extrait dans 250 µL d'eau *Milli-Q* et transférer dans un tube à centrifugation;
- Centrifuger à 4 000 min^{-1} pendant 10 min avant d'analyser le surnageant par HPLC.

Selon Rawn et al. (2005), l'anatoxine-a présente dans la biomasse algale peut être efficacement récupérée en présence d'une solution de MeOH:eau (75:25, v/v) acidifiée par de l'acide chlorhydrique (0,2 M). Afin de favoriser l'extraction de l'anatoxine-a, il est recommandé de réaliser deux cycles d'extraction en ajoutant 10 mL de la solution MeOH:eau à 1,5 g de biomasse algale. Après 3 min d'homogénéisation, l'échantillon est transféré dans un tube de centrifugation d'une capacité de 50 mL pour centrifugation à 4 500 rpm pendant 10 min.

Différentes méthodes d'extraction et de lyse cellulaire sont actuellement utilisées par les laboratoires d'analyse à travers le monde et sont présentées au Tableau 5.3. Les principaux solvants d'extraction utilisés sont l'acide acétique, le MeOH acidifié (acide acétique 0,1%; acide chlorhydrique 0,1% ou acide trifluoroacétique 0,1%) ou non, et l'éthanol à 5%. Afin de favoriser la lyse cellulaire et, par conséquent, la solubilisation de l'anatoxine-a ou de ses produits de dégradation, les différents laboratoires préconisent des étapes de lyophilisation (13 laboratoires sur 33), des cycles de congélation-décongélation (14 laboratoires sur 33) ou l'ultrasonication (7 laboratoires sur 33), souvent suivis par des étapes d'extraction et, ensuite, de centrifugation ou de filtration pour séparer les fractions solide et liquide. Le surnageant peut ensuite analysé directement, ou suite à une dérivation de l'anatoxine-a en présence de 4-fluoro-7-nitro2,1,3-benzoxidiazole afin de favoriser sa détection par HPLC-fluorescence.

5.2.2.2 BMAA

À ce jour, il n'existe aucun protocole standard défini au niveau International (norme ISO) ou National pour les étapes de lyse cellulaire à réaliser pour permettre la détection et la quantification de la ß-N-méthylamino-L-alamine (BMAA) intracellulaire ou de la BMAA liée aux protéines.

Afin de favoriser la lyse cellulaire permettant de détecter et quantifier la BMAA intracellulaire, Esterhuizen et Downing (2009) préconisent de lyophyliser la biomasse algale pendant toute une nuit à -51°C sous une pression de 350 mTorr puis d'extraire les toxines présentes dans les cellules par sonication (40% de la puissance maximale) en présence d'acide trifluoroacétique (0,1 M). Rosen et al. (2008), quant-à eux, préconisent une extraction en présence d'acide trichloroacétique (0,1 M, 2 x 300 µL), ou d'acétonitrile (70%, 2 x 300 µL), ou d'éthanol (50%), pour 10 mg de lyophilisat (cellules cyanobactériennes lyophilisées), suivie d'une étape d'ultrasonication et de cycles de congélation-décongélation. Une fois l'étape de lyse cellulaire complétée, les auteurs préconisent une centrifugation puis une analyse directe du surnageant par LC/MS/MS. Pour la BMAA liée aux protéines, Esterhuizen et Downing (2009) ont réalisé une hydrolyse acide en présence d'acide chlorhydrique à 6 M et d'acide thioglycolique à 2% à 110°C pendant 24 h, alors que Rosen et al. (2008) ainsi que Li et al. (2010) recommandent respectivement une hydrolyse en présence d'acide chlorhydrique suivie d'une incubation à 100°C pendant 17 h ou 24 h, respectivement.

Tableau 5.3 Récapitulatif des méthodes d'extraction et de lyse cellulaire employées dans les laboratoires contactés afin de rompre les parois cellulaires et favoriser la solubilisation de l'anatoxine-a et/ou de l'homo-anatoxine-a

Pays	Code Laboratoire	Toxines intra-(I) et/ou extra-(E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
Argentine	3	I + E	Lyophilisation puis extraction avec 1,5 mL d'acide acétique (50 mM) puis sonication pendant 5 min. La suspension est vortexée puis centrifugée à 12 000 *g* pendant 15 min. Ajustement du pH du surnageant à 9 avec NH_4OH (6M), ajout de 3 mL de chloroforme puis conservation pendant 15 min à -20°C. Centrifugation à 10 000 *g* pendant 15 min. Évaporation de l'éluat sous N_2 puis récupération dans 500 µL de MeOH.	≈ 85	HPLC/UV ou HPLC/MS
Australie	7	I + E	n.c.*	n.c.	HPLC/UV ou LC/MS/MS
Australie	8	I + E	n.c.	n.c.	HPLC/MS/MS
Canada	16	n.c.	Sonication	n.c.	GC/MS
Canada	18	I + E	Cycle de congélation-séchage ou congélation-décongélation suivi par 2 cycles d'extraction avec MeOH 75% acidifié avec acide acétique 0,1% puis sonication	> 9	HILIC/MS/MS
Espagne	20	I + E	Cycle de congélation-décongélation ou de lyophilisation puis trois cycles de sonication et extraction avec MeOH acidifié. Évaporation à sec puis reconstitution dans 1 mL de MeOH	> 90	LC/MS ou LC/MS/MS
Espagne	21	I + E	n.c.	n.c.	ELISA, HPLC/PDA, HPLC/MS
France	27	I + E	Ajout de 1 mL de MeOH à 100 mL d'échantillon		UHPLC/MS/MS
France	28	I + E	Lyophilisation puis cycle d'extraction en présence de MeOH 75% puis sonication et centrifugation (x2). Évaporation à sec puis reprise dans eau acidifiée (0,1% acide formique)	n.c.	ELISAou HPLC-PDA ou HPLC/MS
France	29	I + E	Ultrasonication puis extraction au MeOH	80 - 120	HPLC/MS

Pays	Code Laboratoire	Toxines intra-(I) et/ou extra-(E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
France	37	E	Filtration sur fibre de verre de 1,2 µm et extraction en présence de MeOH	n.c.	LC/MS/MS
Grèce	43	I + E	Ultrasonication puis extraction au MeOH	70 - 110	ELISA, HPLC-UV, HPLC-PDA, LC/MS/MS
Italie	49	I + E	Cycle de congélation-décongélation, extraction avec 15 mL de MeOH à 75% puis filtration sur filtre de 50 mm de diamètre	≈ 90	HPLC/PDA, HPLC/MS
Japon	50	I + E	Ultrasonication pendant 10 dans un bain à ultra-sons puis extraction dans 5 % éthanol	n.c.	LC/MS
Luxembourg	52	I + E	Méthode en cours de validation	n.c.	HPLC/MS
Nouvelle-Zélande	56	I + E	Lyophilisation en combinaison avec ultra-sonication pendant l'étape de séchage (x3 généralement)	n.c.	HPLC/MS
Pays-Bas	62	I + E (occasionnel)	Extraction pendant 10 min avec eau acidifiée à l'acide formique (0,1%) à 95°C (x3), filtration sur filtre cellulose acétate (0,2 µm), puis centrifugation à 16 g pendant 5 min. Reprise dans 1 mL d'acétonitrile 95% acidifié à l'acide formique (0,1%)	n.c.	LC/MS/MS
Pologne	65	I + E	Sonication à l'aide d'un bain à ultra-sons puis à l'aide d'une sonde à ultra-sons. Extraction en présence de MeOH ou d'acétonitrile	n.c.	ELISA, PP2A, HPLC-PDA, LC/MS/MS
Portugal	66	I + E	Lyophilisation ou congélation-décongélation ou ultra-sonication puis extraction en présence de MeOH entre 5 et 50% en fonction de la matrice	80-86	ELISA, HPLC/UV, HPLC/PDA, LC/MS
Taïwan	75	n.c.	n.c.	n.c.	LC/MS/MS
USA	78	I + E	Cycles de congélation-décongélation puis filtration sur 0,45 µm	n.c.	LC/MS/MS
USA	80	E	Aucune	n.c.	HPLC/MS
USA	81	n.c.	n.c.	n.c.	ELISA
USA	82	I + E	Lyophilisation suivie par une extraction en présence de MeOH à 75% acidifié (0,1 M acide acétique)	n.c.	LC/MS/MS

Pays	Code Laboratoire	Toxines intra-(I) et/ou extra-(E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
USA	83	I + E	Cycle de congélation-décongélation puis sonication	n.c.	ELISA ou LC/MS
USA	84	I + E	3 cycles de congélation-décongélation puis filtration sur 0,45 µm	n.c.	LC/MS/MS
USA	85	I + E	Cycle de congélation-décongélation (x3) puis filtration sur 0,45-µm (Whatman 25 mm Acrodisc GHP)	n.c.	LC/MS/MS
USA	88	I + E	3 cycles de congélation-décongélation, sonication, puis filtration sur 0,45 µm. Conservation des échantillons dans l'azote liquide à -80°C jusqu'à l'analyse	n.c.	UPLC/MS
USA	89	I + E	Sonication puis extraction avec MeOH 50%	n.c.	HPLC après dérivation fluorescence
USA	90	I + E	n.c.	n.c.	HPLC-PDA
USA	91	I + E	Cycle de congélation-décongélation, puis ultrasonication et extraction en présence de MeOH acidifié à l'acide chlorhydrique 1% (1 M). Dérivation par ajout de 4-fluoro-7-nitro2,1,3-benzoxidiazole puis centrifugation	n.c.	HPLC-Fluorométrie
USA	93	I + E	Filtration des échantillons puis ajustement du pH à 7. Dérivation par ajout de 50 µL de 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoadiazole (1 mg/mL dans ACN) dans le noir à T°C ambiante.	n.c.	HPLC/FL
USA	94	I + E	Lyophilisation des échantillons puis extraction en présence de MeOH 75% acidifié à 0,1% avec du TFA. Combinaison du filtrat et de l'extrait, puis ajustement du pH entre 9,5 et 10,0 à l'aide d'une solution tampon de borax. Ajout de nodularine comme étalon interne. Ajout de gel de silice C18 et agitation pendant 1 h puis filtration. Séchage pendant 2 h du gel de silice C18 puis désorption des analytes en présence d'une solution de MeOH/TFA. Centrifugation puis évaporation à sec, et récupération dans du MeOH 50% acidifié avec 0,1% TDFHA	n.c.	LC-(ESI)MS/MS

**n.c. : non communiqué*

Après incubation, l'excès d'acide chlorhydrique est évaporé et l'extrait est repris dans de l'eau puis filtré avant d'être analysé par LC/MS/MS (Rosen et al. 2008). Esterhuizer et Downing (2011) quant-à-eux recommandent de filtrer l'extrait sur un filtre en acétate de cellulose (porosité 0,22 µm) et d'ajuster le pH de la solution à 2,5 ± 0,5 avant de réaliser l'étape de dérivation à l'aide du kit *EZ* : *Faast*™ pour analyse des acides aminés par LC/MS.

Parmi les 98 laboratoires ayant participé à notre étude, seuls 7 laboratoires font l'analyse de la BMAA dans les échantillons d'eau récréative ou de consommation. Le Tableau 5.4 présente les différentes méthodes de préparation utilisées par ces laboratoires pour favoriser la lyse cellulaire et l'extraction de la BMMA permettant de quantifier les toxines intra-cellulaires.

Tableau 5.4 Récapitulatif des méthodes d'extraction et de lyse cellulaire utilisés dans les laboratoires contactés afin de rompre les parois cellulaires et favoriser la solubilisation de la BMAA

Pays	Code Laboratoire	Toxines intra- (I) et/ou extra-(E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
Canada	17	I	Lyophilisation puis dérivation pré-colonne à l'aide d'un kit *AccQ-Fluor*™ *Reagent (Waters)*	n.c.*	LC/MS/MS
Grèce	43	I + E	Ultrasonication puis extraction en présence de MeOH	70 - 110	LC/MS/MS
Pays-Bas	62	I + E (occasionnel)	n.c.	n.c.	LC/MS/MS
Pologne	65	I + E	Sonication à l'aide d'un bain à ultra-sons. Extraction en présence de MeOH ou acétonitrile	n.c.	ELISA; LC/MS/MS
Suéde	72	I	Cycles (x3) de congélation-décongélation dans azote liquide puis cycles (x3) de sonication sur glace avec extraction en présence de MeOH 20%	n.c.	LC/MS
USA	82	I + E	Lyophilisation pour les échantillons très dense. Ultrasonication à l'aide d'une sonde 3/4", 60% de la puissance maximale, pulsée à 50%. Extraction à l'acide trichloroacétique (0,1 M)	n.c.	LC/MS/MS
USA	89	I + E	Sonication puis extraction avec MeOH 50%	n.c.	LC/MS ; LC/MS/MS

**n.c. : non communiqué.*

5.2.2.3 Cylindrospermopsine

À ce jour, il n'existe aucun protocole international (norme ISO) pour la préparation et le dosage de la cylindrospermopsine ou de ses analogues.

Au niveau Européen, la récupération de la cylindrospermopsine est réalisée selon le protocole opératoire standard (SOP_TOXIC_UDU_07F) établi par par Meriluoto et Spoof (2005a) et présenté dans la section précédente pour l'anatoxine-a.

Une étude comparative a été réalisée parmi six laboratoires à travers le monde afin d'évaluer l'influence des étapes de lyse cellulaire et d'extraction sur l'efficacité de récupération de la cylindrospermopsine (Törökné et al. 2004). Selon les auteurs, la préparation des échantillons par un cycle de congélation-décongélation, suivie par une extraction en présence de MeOH (méthode 1) ou l'extraction en présence de chloroforme:MeOH (1:1, v/v), suivie par une extraction en présence d'acétate d'ammonium 0,005 M:MeOH (1:1, v/v) ne s'avère pas très efficace, entraînant une perte de près de 20% de la cylindrospermopsine. Selon les auteurs de cette étude, les étapes de préparation des échantillons de biomasse algale les plus efficaces comprennent des étapes d'ultra-sonication, suivies par une ou plusieurs étapes d'extraction en présence d'eau, d'eau acidifiée à l'acide formique (5%) ou d'une solution de NaCl (0,9%), et une séparation solide/liquide par centrifugation puis filtration sur 0,45 µm ou ultra-filtration. Cependant, l'extraction en présence d'eau uniquement ou d'une solution de NaCl (0,9%) entraîne la solubilisation de contaminants qui influencent la qualité des chromatogrammes obtenus (mauvaise séparation des pics). L'utilisation d'acide formique lors des étapes d'extraction permet d'éliminer les composés qui pourraient interférer ou co-éluer lors de l'analyse par HPLC en mode isocratique (phase mobile : MeOH 5% (v/v) acidifié à l'acide trifluoroacétique (0,1%, v/v)), et semble donc être le meilleur compromis efficacité d'extraction/qualité du chromatogramme.

Différentes méthodes d'extraction et de lyse cellulaire sont actuellement utilisées par les laboratoires d'analyse à travers le monde pour la détection de la cylindrospermopsine et de la déoxy-cylindrospermopsine (Tableau 5.5). Les principaux solvants d'extraction utilisés sont :

- L'eau acidifiée (acide formique 5% avec 0,9% de NaCl ou non) ou non;
- Le MeOH acidifié (acide acétique ou TFA) ou non;
- L'acétonitrile;
- Le carbonate de potassium, K_2CO_3.

Tableau 5.5 Récapitulatif des méthodes d'extraction et de lyse cellulaire employées dans les laboratoires contactés afin de rompre les parois cellulaires et favoriser la solubilisation de la cylindrospermopsine et/ou de la déoxycylindrospermopsine

Pays	Code Laboratoire	Toxines intra- (I) et/ou extra- (E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
Australie	7	I + E	Ultrasonication à l'aide d'une sonde Branson	n.c.*	HPLC/UV ou LC/MS/MS
Australie	8	I + E	n.c.	n.c.	HPLC/MS/MS
Brésil	11	I + E	Cycle de congélation-décongélation puis ultrasonication, suivi par une lyophilisation. Extraction en présence d'eau ultra-pure puis centrifugation de l'échantillon	n.c.	ELISA, HPLC/PDA, LC/MS/MS
Canada	18	I + E	Cycle de congélation-séchage ou congélation-décongélation, suivi par 2 cycles d'extraction avec MeOH 75% acidifié à l'acide acétique 0,1% puis sonication	> 90	HPLC/UV, HPLC/PDA, LC/MS
Espagne	20	I + E	Cycle de congélation-décongélation ou de lyophilisation, puis 3 cycles de sonication et extraction avec MeOH acidifié. Évaporation à sec puis reconstitution dans 1 mL de MeOH	> 90	LC/MS ou LC/MS/MS
Espagne	21	I + E	n.c.	n.c.	ELISA, HPLC/PDA, HPLC/MS
France	27	I + E	Extraction par ajout de 1 mL de MeOH à 100 mL d'échantillon	n.c.	UHPLC/MS/MS
France	28	I + E	Lyophilisation ou congélation-décongélation ou ultrasonication	n.c.	ELISA
France	29	I + E	Ultrasonication puis extraction au MeOH	80 - 120	HPLC/MS
France	37	E	Extraction en présence de MeOH	n.c.	LC/MS/MS
Grèce	43	I + E	Ultrasonication puis extraction en présence de MeOH	70 - 110	ELISA, HPLC-UV, HPLC-PDA, LC/MS/MS
Grèce	44	I + E	Cycles de congélation-décongélation (x3), sonication, puis filtration sur 0,45 µm. Extraction avec 5 mL d'eau acidifiée avec 5% d'acide formique et 0,9% de NaCl	n.c.	ELISA
Grèce	45	I + E	Lyophilisation puis extraction à l'acide formique, puis agitation toute la nuit suivie par une centrifugation (1300 g pendant 15 min)	n.c.	ELISA

Pays	Code Laboratoire	Toxines intra- (I) et/ou extra- (E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
Israël	48	I + E	Lyophilisation des échantillons suivie par une extraction des lyophilisats à l'acide formique 5% dans 0,9% NaCl. Concentration par centrifugation	n.c.	HPLC-PDA
Italie	49	I + E	Cycle de congélation-décongélation puis extraction avec 15 mL de MeOH à 75%, puis filtration sur filtre de 50 mm de diamètre	≈ 90	HPLC/PDA, LC/MS
Japon	50	I + E	Ultrasonication pendant 10 min dans un bain à ultra-sons. Extraction avec 0,1 M K_2CO_3.	> 90	LC/MS
Norvège	55	I + E	Cycle de congélation-décongélation	n.c.	ELISA
Nouvelle-Zélande	56	I + E	Lyophilisation en combinaison avec ultra-sonication pendant l'étape de séchage (x3 généralement)	n.c.	HPLC/MS
Pays-Bas	62	I + E (occasionnel)	Extraction pendant 10 min avec eau acidifiée à l'acide formique (0,1%) à 95°C (x3), filtration sur filtre de cellulose acétate (0,2 µm), puis centrifugation à 16 g pendant 5 min. Reprise dans 1 mL d'acétonitrile 95% acidifié à l'acide formique (0,1%)	n.c.	LC/MS/MS
Pologne	65	I + E	Sonication à l'aide d'un bain à ultra-sons puis à l'aide d'une sonde à ultra-sons. Extraction en présence de MeOH ou acétonitrile	n.c.	ELISA, HPLC-PDA, LC/MS/MS
Portugal	66	I + E	Lyophilisation ou congélation-décongélation ou ultra-sonication, puis extraction MeOH entre 5 et 50% en fonction de la matrice	80-86	ELISA, HPLC/UV, HPLC/PDA, LC/MS
République Tchèque	67	I + E	Lyophilisation de 100 mg de matériel, puis extraction avec 1 mL de MeOH à 50%, suivi par une sonication pendant 20 min et une centrifugation à 16 600 g pendant 15 min	> 90	Détection: ELISA, Routine: LC/MS
Slovaquie	69	I + E	Lyophilisation puis ultrasonication pendant 2 min, puis extraction avec MeOH (50%) acidifié au TFA (0,1%)	80 - 120	Tests écotoxicologiques, HPLC/PDA
Sri Lanka	71	I + E	Cycle de congélation-décongélation ou lyophilisation ou ultrasonication puis extraction avec H_2O	n.c.	ELISA ou HPLC-PDA (récemment développé)
USA	79	I + E	Cycles de congélation-décongélation puis filtration sur 0,45 µm	n.c.	LC/MS/MS
USA	80	E	Aucune	n.c.	HPLC/MS

Pays	Code Laboratoire	Toxines intra- (I) et/ou extra- (E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
USA	81	n.c.	n.c.	n.c.	ELISA
USA	82	I + E	Lyophilisation suivie par une extraction en présence de MeOH à 75% acidifié (0,1 M acide acétique)	n.c.	ELISA avec confirmation des résultats positifs par LC/MS/MS
USA	83	I + E	Cycle de congélation-décongélation puis sonication	n.c.	ELISA ou LC/MS
USA	84	I + E	3 cycles de congélation-décongélation puis filtration sur 0,45 µm	n.c.	ELISA, LC/MS/MS
USA	85	I + E	Cycle de congélation-décongélation (x3)	n.c.	LC/MS/MS
USA	86	I + E	Ultrasonication puis extraction au MeOH acidifié (acide trifluoroacétique)	n.c.	ELISA, HPLC-MS
USA	88	I + E	3 cycles de congélation-décongélation, sonication, puis filtration sur 0,45 µm, et conservation des échantillons dans l'azote liquide à -80°C jusqu'à l'analyse	n.c.	UPLC/MS
USA	89	I + E	Sonication puis extraction avec MeOH 50%	n.c.	HPLC-PDA
USA	90	I + E	n.c.	n.c.	ELISA ou HPLC-PDA
USA	92	I + E	(1) Lyophylisation puis extraction (x3) avec MeOH à 50% acidifié avec 0,1% de TFA pendant 5 min, puis sonication. Centrifugation à 10 000 rpm pendant 15 min, puis filtration sur 0,45 µm (filtre en nylon ou filtre UniPrep GMF), ou (2) Lyophilisation puis extraction avec un système "Dionex Accelerated Solvent Extraction ASE 200". Après (1) ou (2), évaporation du solvant sous N_2, puis récupération avec 10 mL d'eau	n.c.	ELISA
USA	93	I + E	n.c.	n.c.	LC/MS/MS

**n.c. : non communiqué*

Afin de favoriser la lyse cellulaire et, par conséquent, la solubilisation de la cylindrospermopsine et de la déoxycylindrospermopsine, les différents laboratoires préconisent des étapes de lyophilisation (10 laboratoires sur 37), des cycles de congélation-décongélation (14 laboratoires sur 37) ou d'ultrasonication (14 laboratoires sur 37) souvent suivis par des étapes d'extraction, et ensuite de centrifugation ou de filtration pour séparer les fractions solide et liquide.

5.2.2.4 Dermatotoxines

À ce jour, il n'existe aucun protocole standard défini au niveau International (norme ISO) ou National sur les étapes de lyse cellulaire pour la détection et la quantification des dermatotoxines (lipopolysaccharides; l'aplysiatoxine, la debromoaplysiatoxine, la lyngbyatoxine-a). De nos jours, peu de laboratoires à travers le monde analysent les dermatotoxines (seulement 2 laboratoires sur les 79 laboratoires analysant les cyanotoxines et ayant répondu à la présente enquête). Le Tableau 5.6 présente les méthodes de préparation utilisées par ces laboratoires pour favoriser la lyse cellulaire et l'extraction des dermatotoxines permettant la quantification des toxines intra-cellulaires.

Tableau 5.6 Récapitulatif des méthodes d'extraction et de lyse cellulaire utilisées dans les laboratoires contactés afin de rompre les parois cellulaires et de favoriser la solubilisation des dermatotoxines

Pays	Code Laboratoire	Toxines intra- (I) et/ou extra- (E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
USA	82	Dematotoxines (I + E)	Lyophilisation pour les échantillons très dense. Ultrasonication sur 250 mL minimum d'échantillon à l'aide d'une sonde 3/4", 60% de la puissance maximale, pulsée à 50%. Extraction en présence de 5 % d'acide formique dans 100% MeOH ou 100% acétone	n.c.*	LC/MS/MS
USA	84	Lyngbyatoxine (I + E)	3 cycles de congélation-décongélation puis filtration sur 0,45 µm	n.c.	LC/MS/MS

**n.c. : non communiqué.*

5.2.2.5 Microcystines

Différents protocoles ont été développés afin de rompre les parois cellulaires des cyanobactéries et permettre le dosage des microcystines intracellulaires.

Au niveau International, la norme ISO 20179 (2005) décrit les étapes suivantes afin de favoriser la rupture des parois cellulaires et la solubilisation des microcystines intracellulaires (MC-LR, MC-RR et MC-YR):

- Rincer les filtres avec 3 mL de solution d'extraction (MeOH:eau à 75:25 (v/v)). Répéter cette étape trois fois. Si plus d'un filtre a été utilisé lors de l'étape de séparation, combiner les filtres;
- Soniquer la solution sur de la glace pendant 2 min à l'aide d'un sonicateur (caractéristiques du sonicateur: ≈ 60 W, ≈ 20 kHz) ou d'un bain à ultrasons;
- Centrifuger la solution à plus de 4 000 rpm pendant 10 min à température ambiante;
- Après centrifugation, récupérer le surnageant puis l'évaporer à sec sous jet d'azote à 40°C;
- Re-dissoudre l'extrait dans 500 µL d'une solution de MeOH et d'eau à 20:80 (v/v) et soniquer l'échantillon dans un bain à ultra-sons pendant 5 min, avant l'étape de purification.

Au niveau Européen, le protocole opératoire standard établi par Meriluoto et Spoof (2005b) (SOP_TOXIC_AAU_04F) préconise les étapes suivantes pour favoriser la récupération des microcystines intracellulaires:

- Placer les filtres secs et conservés au congélateur dans des tubes ou vials en verre borosilicaté de 12 x 75 mm ou d'une capacité de 1,5 mL; Cette procédure est également valable pour 5 à 8 mg de cellules cyanobactériennes congelées, puis lyophilisées;
- Congeler-décongeler les tubes/vials et répéter cette opération deux fois, ou pour obtenir un maximum de récupération, lyophiliser les filtres.
- Ajouter 1,2 mL d'une solution de MeOH à 75%, mélanger et extraire à l'aide d'un bain à ultra-sons pendant 15 min. Les filtres ayant un diamètre supérieur à 47 mm doivent être extraits avec 2 mL de la solution de MeOH à 75%. Les tubes doivent être couverts lors de l'étape de sonication. Si vous utilisez des vials, ces derniers doivent être bouchés lors de l'étape de sonication;

- Ultrasoniquer pendant une minute l'échantillon à l'aide d'un sonicateur équipé d'une sonde micro-pointe. Laver la sonde avec une solution de MeOH à 75% entre chaque échantillon pour éviter tout risque de contamination;
- Centrifuger l'échantillon à 4 000 rpm pendant 10 min;
- Transférer 500 µL du surnageant dans un tube en verre borosilicaté et évaporer à sec dans un bloc chauffant à 50°C sous une atmosphère d'argon;
- Récupérer l'extrait dans 100 µL d'une solution de MeOH à 75%, homogénéiser et transférer dans un vial en polypropylène d'une capacité de 0,3 mL. Centrifuger à 4 000 rpm pendant 10 min, ou filtrer à travers un filtre pour analyse HPLC.

En Afrique du Sud, le protocole opératoire standard établi par Swanepoel et al. (2008) préconise les étapes suivantes pour favoriser la récupération des microcystines intracellulaires et les toxines présentes sur le filtre utilisé lors de l'étape de séparation solide/liquide:

- Extraire les toxines présentes sur le filtre utilisé lors de l'étape de séparation solide/liquide par ajout de 3 mL d'une solution MeOH:Eau (75:25, v/v). Trois cycles d'extraction doivent être réalisés. Si plus d'un filtre est utilisé lors de l'étape de séparation solide/liquide, combiner les filtres pour les étapes d'extraction;
- Soniquer la solution sur la glace pendant 2 min à l'aide d'une sonde à ultrasons ou d'un bain à ultrasons;
- Centrifuger l'échantillon puis récupérer le surnageant (mesurer le volume de surnageant récolté);
- Prélever 1 mL de surnageant puis l'évaporer à sec sous N2 à 40°C;
- Re-dissoudre l'échantillon dans 500 µL d'une solution de MeOH:Eau (20:80, v/v).

L'extraction des microcystines présentes dans les filtres ou dans les parois cellulaires rompues peut être réalisée en présence d'une solution d'acide acétique ou d'un mélange d'eau et de MeOH (plus fréquemment utilisé). L'acide acétique s'avère très efficace pour les microcystines les plus polaires, mais très inefficace pour l'extraction des microcystines les plus hydrophobes. Le MeOH semble être le solvant le plus adapté car il permet une bonne récupération de l'ensemble des microcystines et il permet une concentration plus rapide et plus facile que l'acide acétique pour les microcystines par évaporation (Afssa et Afsset 2006). Des études ont mis en évidence que la proportion de MeOH dans les mélanges eau/MeOH joue un rôle important sur l'efficacité de récupération de la gamme étendue des

microcystines. Pour les microcystines les plus hydrophobes, l'extraction en présence de MeOH pur s'avère légèrement plus efficace qu'en présence d'une solution eau/MeOH alors qu'elle est peu efficace pour les microcystines les plus polaires. D'après les laboratoires contactés à travers le monde, la méthode d'extration et de lyse cellulaire le plus fréquemment utilisée est celle recommandée par la norme ISO 20179 (2005), par conséquent, la solution d'extraction la plus fréquemment utilisée est une solution aqueuse de MeOH à 75% (Tableau 5.7).

Une comparaison inter-laboratoire a été réalisée par Fastner et al. (2002) afin de comparer les méthodes d'analyse utilisée pour la détermination, l'identification et la quantification des microcystines par 31 laboratoires provenant de 13 pays différents. Cette étude regroupe les différentes techniques d'extraction et de lyse cellulaire utilisées par les laboratoires participants (Tableau 5.8). L'étude de comparaison inter-laboratoire n'a cependant pas permis de conclure quant à l'influence des étapes de préparation des échantillons (extraction, lyse cellulaire, purification sur cartouche) sur la répétabilité (7 à 15%) et la reproductibilité (30 à 50%) des résultats obtenus par les laboratoires participants. Les variations observées sur les teneurs en microcystines peuvent venir aussi bien des étapes de préparation des échantillons que du mode de quantification utilisé (test ELISA, test PPIA, HPLC-UV ou HPLC MS).

Tableau 5.7 Récapitulatif des méthodes d'extraction et de lyse cellulaire employées dans les laboratoires contactés afin de rompre les parois cellulaires et favoriser la solubilisation des microcystines

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Toxines analysées	Toxines intra- (I) et/ou extra- (E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
Afrique du Sud	1	G*	MCs	I + E	Cycle de congélation-décongélation	n.c.**	ELISA
Allemagne	2	?	MC-LR, MC-RR et MC-YR	I + E	Filtration puis congélation suivi d'une lyophilisation et stockage à -20°C jusqu'à extraction en présence de MeOH	n.c.	HPLC-UV
Argentine	3	?	MC-LR, MC-RR, MR-YR, MC-LA, Nodularine	I + E	Filtration d'1 L d'échantillon sur filtre 0,45 µm (Millipore) puis séchage des filtres et conservation dans des feuilles d'aluminium à -20 °C. Extraction avec 1,5 mL avec de l'acide acétique (5%) puis sonication pendant 5 min. La suspension est centrifugée à 9 300 g pendant 3 min	≈ 85	HPLC/UV ou HPLC/MS
Australie	7	G	MCs	I + E	Ultrasonication à l'aide d'une sonde Branson	n.c.	HPLC/UV ou LC/MS/MS
Australie	8	G	MC-LR, MC-RR, MC-YR, Nodularines	I + E	Pré-concentration des échantillons (méthode non indiquée)	n.c.	HPLC/PDA
Autriche	10	?	MC-LR, MC-RR, MC-YR	I + E	n.c.	n.c.	ELISA, PP2A, HPLC-PDA
Brésil	11	R***	MCs	I + E	Cycle de congélation-décongélation puis ultrasonication suivie par un cycle de congélation-séchage. Extraction en présence de MeOH acidifié à l'acide trifluoroacétique (0,1%)	90 - 100	ELISA, HPLC/PDA, LC/MS/MS
Bulgarie	12	?	MCs	I + E	n.c.	n.c.	ELISA

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Toxines analysées	Toxines intra- (I) et/ou extra- (E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
Canada	13	G	MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LA, MC-LF, MC-LW, MC-LY, Anatoxine-a	n.c.	Cycle d'extraction (x2) à l'aide de MeOH 75% dans un bain à ultra-sons (2 x 10 min) puis évaporation à sec de l'extrait recueilli à 26°C sous atmosphère d'argon, puis ajout de standard d'injection (atrazine-d5 à 100 µg.L^{-1})	n.c.	HPLC/MS/MS
Canada	16	G et R	MC-LR, MC-RR, MC-YR	n.c.	Sonication	n.c.	HPLC/MS/MS
Canada	17	?	MC-LR,MC-LA, MC-LY,MC-LW,MC-RR	n.c.	Sonication	n.c.	LC/MS/MS
Canada	18	R	MCs	I + E	Cycle de congélation-séchage ou congélation-décongélation, suivi par 2 cycles d'extraction avec MeOH 75% acidifié à l'acide acétique 0,1%, puis sonication	> 90	HPLC/UV, HPLC/PDA, LC/MS
Danemark	19	G	MC-LR, MC-RR, MC-YR, DM-MC-LR, DM-MC-RR, MC-LF, MC-MW, MC-LY, Nodularines	I + E	3 cycles de congélation-décongélation, extraction des CT intra dans les filtres avec MeOH 75%, sonication dans l'eau froide pendant 10 min, extraction au froide pendant 10 min, extraction au congélateur pendant 30 min, filtration sur 0,2 µm	> 95	HPLC/PDA
Espagne	20	?	MCs	I + E	Cycle de congélation-décongélation ou de lyophilisation, 3 cycles de sonication, puis extraction avec MeOH acidifié. Évaporation à sec puis reconstitution dans 1 mL de MeOH	> 90	LC/MS ou LC/MS/MS

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Toxines analysées	Toxines intra- (I) et/ou extra- (E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
Espagne	21	R	MCs	I + E	Extraction des toxines dans le filtre avec MeOH 90% pendant 24 h (x2), centrifugation, filtration sur filtre GF/F, évaporation, récupération dans MeOH, puis filtration sur filtre téflon 0,5 µm	n.c.	ELISA, HPLC/PDA, LC/MS
Estonie	23	R	MCs	I + E	2002: Lyophilisation, extraction à l'eau, ultrasonication pendant 15 min, congélation, extraction avec MeOH, ultrasonication pendant 45 min, centrifugaton à 500 g pendant 20 min, puis filtration sur adsorbant Silasorb C18; 2003-2004: Cycle de congélation-décongélation à 75-80°C (x2), ultrasonication pendant 45 min à T ambiante, puis filtration	n.c.	HPLC-PDA, LC/MS
Finlande	24	G	MC-LR,Nodularine-R	I + E	Filtration sur filtre GF/C, congélation-séchage, pesée de la biomasse, puis extraction (x3) avec 1mL de MeOH 75% à l'aide d'un bain à ultra-sons	Non déterminé	ELISA et HPLC/PDA
France	26	G	MC-LR, MC-YR, MC-RR	I + E	Lyse cellulaire par ajout de MeOH puis ultra-sonication	n.c.	HPLC/MS
France	27	G	MC-LR, MC-YR, MC-RR, Nodularine	I + E	Ajout de 5 mL de MeOH à 500 mL d'échantillon	MCs > 70%	HPLC/MS
France	28	R	MCs,	I + E	Lyophilisation ou congélation-décongélation ou ultrasonication	n.c.	ELISA ou PP1A ou LC/MS
France	29	G	MC-LR, MC-YR, MC-RR, Nodularine	I + E	Ultrasonication puis extraction au MeOH	80 - 120%	LC/MS
France	30	G	MCs	I	Congélation-décongélation, ultrasonication, puis extraction MeOH/eau (75/25)	≈ 90%	ELISA

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Toxines analysées	Toxines intra- (I) et/ou extra- (E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
France	31	R	MCs	I + E	Filtration de 300 mL d'échantillon sur filtre en fibre de verre GF/C (Whatman), 3 extractions avec MeOH (75%), puis ultrasonication pendant 5 min	> 80	PPIA
France	32	G	MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LF, MC-LW, NODs	I + E	Ajout de MeOH et passage aux ultra-sons	n.c.	Injection directe LC/MSMS
France	33	G	MCs	I + E	Cycle de congélation-décongélation	n.c.	ELISA
France	34	G	MCs	I + E	Extraction des toxines sur le filtre à l'aide de MeOH à 80% pendant au moins une heure. Filtration des échantillons juste avant l'analyse, sinon conservation possible à 4°C jusqu'à 11 jours après l'extraction	n.c.	HPLC/UV
France	35	G	MCs dans les poissons: MC_LR, MC-RR, MC-LF, MC-LW , MC-YR et NODs	Toxines liée de façon covalente	Extraction Eau/Butanol/MeOH (75/5/20)	Taux de récupération convenable si entre 80 et 120	LC/MS
France	36	?	MCs	I + E	Filtration, cycle d'extraction de MC intra-cellulaires sur le filtre en présence de MeOH 75 %, puis sonication pendant 20 min (x2). Centrifugation à 20 000 rpm pendant 90 min à 4°C. Récupération du surnageant, filtration sur 0,2 µm (PTFE, Whatman), puis évaporation et récupération dans MeOH (20%)	n.c.	HPLC-PDA

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Toxines analysées	Toxines intra- (I) et/ou extra- (E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
France	37	?	MC-LR,MC-RR,MC-YR,MC-LA,MC-LW,MC-LF,MC-LY, NODs	E	Filtration sur filtre en fibre de verre de 1,2 µm et extraction en présence de MeOH	n.c.	LC/MS/MS
Grèce	43	?	MCs, Nodularines	I + E	Ultrasonication puis extraction au MeOH	70 - 110	ELISA, PP2A, HPLC-UV, HPLC-PDA, LC/MS/MS
Grèce	44	G	MC-LR,MC-RR, MCs,	I + E	Cycles de congélation-décongélation (x3), sonication, filtration sur 0,45 µm, puis extraction avec 5 mL de MeOH ou avec 5 mL d'eau et 5% d'acide formique	92 - 95	Bioessais sur souris, ELISA ou HPLC
Grèce	45	?	MCs	I + E	Filtration sur filtre GF/C, cycle de congélation-séchage, extraction avec MeOH 95% , puis agitation toute la nuit suivie par une centrifugation (1300 g pendant 15 min)	90-92	ELISA
Hongrie	46	?	MC-LR, MC-RR, MC-YR	I	Ajustement du pH (si nécessaire) entre 5 et 8 par ajout de TFA ou d'hydroxide d'ammonium. Filtration sur filtre 0,45 µm, puis extraction avec thiosulphate de sodium (0,1%) pendant 5 min puis avec TFA (10%)	n.c.	HPLC-UV
Inde	47	?	MCs	I	Lyophilisation de la biomasse algale puis extraction en présence de MeOH (x2) et concentration sous vide	n.c.	Analyse qualitative
Israël	48	?	MCs	I + E	Lyophilisation des échantillons suivie par une extraction des lyophilisats avec MeOH 100%. Concentration par centrifugation puis purification sur colonne ultrafiltration	75 - 92	HPLC-PDA

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Toxines analysées	Toxines intra- (I) et/ou extra- (E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
Italie	49	R	MC-RR, MC-RRdm,MC-LR,MC-LRdm,MC-YR, MC-LF, MC-WR,MC-LA,MC-LW	I + E	Filtration sur filtre GF/C, cycle de congélation-décongélation, extraction avec 15 mL de MeOH à 75%, puis filtration sur filtre de 50 mm de diamètre	≈ 90	HPLC/PDA, HPLC/MS
Japon	50	?	MC-RR, MC-LR,MC-WR, MC-FR, 7dmMC-LR	I + E	Ultrasonication pendant 10 dans un bain à ultra-sons. Extraction avec 5 % d'ethanol puis avec du MeOH	> 90	LC/MS
Luxembourg	52	R	MC-LR, MC-LF, MC-LW, MC-RR, MC-YR	I + E	3 cycles d'extraction avec 15 mL de MeOH 75%, sonication pendant 4 min, puis centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min. Récupération des surnageants (45 mL) puis filtration sur membrane en nylon (0,45 µm)	50 - 76	HPLC/MS
Macédoine	53	R	MCs	I + E	Lyophilisation	n.c.	ELISA
Namibie	54	G	MCs	n.c.	Congélation des échantillons pendant 24 h et plus, puis décongélation le jour de l'analyse à température ambiante	n.c.	ELISA
Norvège	55	R	MCs;	I + E	Cycle de congélation-décongélation	n.c.	ELISA
Nouvelle-Zélande	56	G	MCs/NODs	I + E	Lyophilisation en combinaison avec ultra-sonication pendant l'étape de séchage (x3 généralement)	n.c.	HPLC/MS
Nouvelle-Zélande	59	G	MCs, NODs	n.c.	n.c.	n.c.	ELISA
Pays-Bas	61	R	MC-LR, MC-RR, MC-YR, Nodularines	I	Cycle de congélation-séchage, ultrasonication, puis extraction par ajout de MeOH à 50% pendant 30 min (grade analytique)	n.c.	ELISA etHPLC-DAD (majoritairement) LC/MS

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Toxines analysées	Toxines intra- (I) et/ou extra- (E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
Pays-Bas	62	?	dm-7-MC-RR, MC-RR, MC-YR, dm-7-MC-LR, MC-LR, MC-LY, MC-LW, MC-LF, Nodularines,	I + E (occasionnel)	Cycle de lyophilisation pendant 2h, extraction avec MeOH (75%) à 60°C (x3), évaporation à sec et reprise dans 800 µL, filtration sur filtre en cellulose acétate, puis centrifugation à 16 g pendant 15 min	54 - 106	LC/MS/MS
Pologne	63	R	MCs	I + E	Lyophilisation (essais d'ultrasonication mais pas de comparaison des deux méthodes à ce jour)	n.c.	ELISA
Pologne	64	R	MC-LR, MC-RR	I + E	Lyophilisation, extraction à l'aide de MeOH 75%, sonication pendant 5 sec, incubation à 4°C pendant 1 h, centrifugation à 11 000 g pendant 10 min, évaporation, puis reprise dans MeOH 75%	n.c.	ELISA, PPIA, HPLC/UV
Pologne	65	?	(dm) MC-RR, (dm) MC-LR, MC-YR, MC-LA, MC-LY, NODs	I + E	Sonication à l'aide d'un bain à ultra-sons puis à l'aide d'une sonde à ultra-sons. Extraction en présence de MeOH ou acétonitrile	n.c.	ELISA, PPIA, HPLC-PDA, LC/MS/MS
Portugal	66	?	MCs	I + E	Lyophilisation ou congélation-décongélation ou ultra-sonication, puis extraction en présence de MeOH entre 5 et 50% en fonction de la matrice	80-86	ELISA, HPLC/UV, HPLC/PDA, LC/MS
République Tchèque	67	?	MCs	I + E	Lyophilisation de 100 mg de matériel, extraction avec 1 mL de MeOH à 50%, sonication pendant 20 min, puis centrifugation	n.c.	Détection: ELISA, Routine: HPLC-PDA et LC/MS

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Toxines analysées	Toxines intra- (I) et/ou extra- (E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
Royaume-Uni	68	R	MCs	I + E	Lyophilisation du filtre directement dans la boîte de Pétri (24 h environ) et noter la masse du lyophilisat. Centrifugation de 1 mL d'échantillon d'eau brute à 5 000 g pendant 5 min puis récupération du surnageant	n.c.	ELISA
Slovaquie	69	G	MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LA, MC-LW, MC-LF	I + E	Cycle delyophilisation puis ultrasonication pendant 2 min puis extraction avec MeOH (50%) acidifié au TFA (0,1%)	80 - 120	Tests écotoxicologiques, HPLC/PDA
Slovénie	70	?	MC-LR, MC-YR, MC-RR, MC-Seco3 RR	I + E	Lyophilisation puis extraction en présence d'acide acétique	n.c.	PPIA, HPLC-PDA, LC/MS
Sri Lanka	71	?	MCs	I + E	Filtration sur filtre GF/C, cycle de congélation-décongélation du filtre et extraction avec 10 mL de MeOH pdt 1 h (x2). Évaporation à sec à 40°C puis reprise dans 2x250 µL de MeOH.	n.c.	PP2A ou HPLC-PDA (moins utilisé)
Suisse	73	R	MC-LR, MC-RR, MC-YR,	I + E	Cycle de congélation-décongélation, ultrasonication, puis extraction avec MeOH (60-80%)	n.c.	HPLC-UV, HPLC-PDA, LC/MS
Suisse	74	?	MC-RR, [D-Asp3, E-Dhb7] - MC RR, MC-LR, MC-YR	I + E	Cycle de congélation-décongélation ou ultrasonication, puis extraction avec MeOH 75%	100	LC/MS/MS
Taïwan	75	G	MC-LR, MC-RR	n.c.	n.c.	n.c.	LC/MS/MS
Taïwan	76	G	MC-R, MC-RR, MC-YR,MC-LF, MC-LW	n.c.	n.c.	n.c.	ELISA
Turquie	77	?	MCs, Nodularines	I + E	Cycle de congélation-séchage, extraction du lyophilisat avec MeOH 70%, ultrasonication, puis centrifugation	n.c.	ELISA, PPIA, HPLC-PDA

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Toxines analysées	Toxines intra- (I) et/ou extra- (E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
USA	78	G	MC-LR, MC-LA,MC-YR,MC-RR, Nodularine	I + E	Cycles de congélation-décongélation puis filtration sur 0,45 µm	n.c.	LC/MS/MS
USA	80	?	MC-LR, MC-YR, MC-RR, Nodularine	E	Aucune	n.c.	LC/MS
USA	81	G	MCs, Nodularines	n.c.	n.c.	n.c.	ELISA
USA	82	G	MCs, Nodularines	I + E	Lyophilisation pour les échantillons très dense, ultrasonication sur 250 mL minimum d'échantillon à l'aide d'une sonde 3/4" à 60% de la puissance maximale pulsée à 50%, puis extraction en présence de 75% de MeOH	n.c.	ELISA pour criblage puis confirmation des essais positifs par LC/MS/MS
USA	83	G	MC-LR	I + E	Cycle de congélation-décongélation ou de lyophilisation	n.c.	ELISA ou LC/MS
USA	84	?	MCs	I + E	3 cycles de congélation-décongélation puis filtration sur 0,45 µm	n.c.	ELISA, LC/MS/MS
USA	85	?	MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LA	I + E	Cycle de congélation-décongélation (x3)	n.c.	ELISA ou LC/MS/MS
USA	86	G	MCs	I + E	Ultrasonication puis extraction au MeOH	n.c.	ELISA, HPLC-UV, HPLC-PDA, HPLC-MS
USA	87	?	MCs	I + E	Cycle de congélation-décongélation	n.c.	LC/MS/MS
USA	88	R	MC-LR, MC-LF, MC-RR	I + E	3 cycles de congélation-décongélation, sonication, filtration sur 0,45 µm, puis conservation des échantillons dans l'azote liquide à -80°C jusqu'à l'analyse	n.c.	UPLC/MS

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Toxines analysées	Toxines intra- (I) et/ou extra- (E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
USA	89	?	MCs	I + E	Sonication puis extration avec MeOH 50%	n.c.	PPIA et confirmation par HPLC-PDA si concentration > 0,5 µg.L^{-1}
USA	90	?	MCs	I + E	n.c.	n.c.	ELISA ou HPLC-PDA
USA	91	?	MCs	I + E	Cycle de congélation (12 h)-décongélation à température ambiante, ultasonication, filtration sur 0,45 µm, puis extraction en présence de MeOH 75% et de MeOH 75% acidifié à l'acide acétique (0,4%)	n.c.	ELISA - PPIA
USA	92	R	MCs	I + E	(1) Lyophylisation puis extraction (x3) avec MeOH à 50% acidifié avec 0,1% de TFA pendant 5 min, sonication, centrifugation à 10 000 rpm pendant 15 min, filtration sur 0,45 µm, ou (2) Lyophilisation puis extraction avec un système "Dionex Accelerated Solvent Extraction ASE 200". Après (1) ou (2), évaporation du solvant sous N_2 puis récupération avec 10 mL d'eau.	n.c.	ELISA
USA	93	R	MCs, Nodularines	I + E	Lyophilisation des échantillons puis extraction en présence de MeOH ou d'EtOH (5%)	n.c.	ELISA ou LC/MS ou SELDI/TOFMS

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Toxines analysées	Toxines intra- (I) et/ou extra- (E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
USA	94	G	MC-LR, MC-RR, MC-LA, MC-LY	I + E	Lyophilisation des échantillons puis extraction en présence de MeOH 75% acidifié à 0,1% avec du TFA. Combinaison du filtrat et de l'extrait puis ajustement du pH entre 9,5 et 10 à l'aide d'une solution tampon de borax. Ajout de nodularine comme étalon interne. Ajout de gel de silice C18 et agitation pendant 1 h puis filtration. Désorption désorption des analytes en présence d'une solution de MeOH/TFA. Centrifugation puis évaporation à sec et récupération dans du MeOH 50% acidifié par 0,1% TDFHA	n.c.	LC-(ESI)MS/MS
USA	95	G	MCs et NODs	I + E	Cycles de congélation (azote liquide)-décongélation (bain-marie à 75°C) puis sonication et filtration	≈ 99%	UPLC/MS
USA	96	?	MCs	n.c.	n.c.	n.c.	ELISA

**n.c. : non communiqué.*

Tableau 5.8 Récapitulatif des méthodes d'extraction et de lyse cellulaire utilisées par les laboratoires participants à la comparaison inter-laboratoires organisée par (Fastner et al. 2002)

Code de Laboratoire	Solvant	Procédure	Nb de cycles
H2/E2	H_2O + 100% MeOH	Sonication 10 min avec eau, rinçage 30 min, centrifugation, répéter avec MeOH, récupération du surnageant	2
H3/E3/P3	70% aq. MeOH	Rinçage 1 h, sonication, centrifugation	1
H4	75% aq. MeOH	Sonication 15 min, centrifugation, purification SPE	2
H5	75% aq. MeOH	Sonication 10 min, agitation 30 min, centrifugation	3
H6	H_2O	Lavage, rinçage 5 min, lavage, centrifugation	1
H8	100% MeOH	Sonication 2 min, extraction 2 h, solubilisation dans 20% MeOH aqueux, centrifugation, extraction SPE	1
H9	50% aq. MeOH	Lavage 30 sec, sonication, centrifugation	3
H10/E10	100% MeOH	Sonication 15 min, centrifugation	3
H11/E11/P11	75% aq. MeOH	Sonication 2 min, centrifugation, purification SPE	3
H12	100% MeOH	Extraction 12 h	1
H14/E14	100% MeOH	Ultra-Turrax 5 min, sonication 8 h, centrifugation, dilution avec H_2O, filtration	1
H15	50% aq. MeOH	Purification SPE	1
E16	H_2O	Cycle de congélation-décongélation	2
H17	75% aq. MeOH	Sonication 10 min, centrifugation 10 min, dilution 1:1 avec H_2O	1
H18	75% aq. MeOH	Sonication sur glace, centrifugation, filtration	1
H19	75% aq. MeOH – 25% ac. Acétique (pH 3,5)	Sonication, agitation 30 min, centrifugation, dilution solvant	1
H20	100% MeOH + 0,01% TFA	Extraction 1 h	2
H21	100% MeOH	Sonication 1 h sur glace, centrifugation	1
H22T/H22	5% acide acétique + 100% MeOH	Extraction 1 x 5% acide acétique + 2 x 100% MeOH, purification SPE	3
H23	5% acide acétique	Extraction, centrifugation, purification SPE	3
H24	20% aq. MeOH	Sonication, centrifugation, filtration	1
H25	70% MeOH + H_2O	Extraction 70% MeOH aqueux, sonication 15 sec, centrifugation H_2O, sonication 10 min sur glace, centrifugation, purification SPE	1
H27	H_2O + 100% MeOH	Extraction avec H_2O, centrifugation, extraction avec 100% MeOH, purification SPE	2
H29/E29	BuOH – MeOH-H_2O (5:20:75, v/v)	Extraction, évaporation à 1/3 du volume, purification SPE	1
E30/P30	75% MeOH + H_2O	Sonication 10 min, agitation 30 min, centrifugation	3

Code de Laboratoire	Solvant	Procédure	Nb de cycles
H31	75% MeOH + H_2O	Sonication 2 min, décantation	2
H32MS	50% MeOH + H_2O	Rinçage 2 h, sonication 15 min, centrifugation, filtration	1
H33	H_2O	Sonication, centrifugation, purification SPE	1
H34	100% MeOH	Sonication, centrifugation	3
H35	ACN-acétate d'ammonium (27 :73)	Lavage, sonication 10 min, centrifugation	2

5.2.2.6 Saxitoxines

À ce jour, il n'existe aucun protocole d'opération standard International (norme ISO) ou Européen pour la préparation et le dosage des saxitoxines. Cependant, deux méthodes de détection et de quantification ont été validées et approuvées comme étant des méthodes officielles pour le dosage des saxitoxines par l'*Association of Official Analytical Chemists International* – AOAC International. La **méthode AOAC 959.08** (2010) est actuellement la méthode officielle de surveillance des saxitoxines dans les fruits de mer à l'aide de bio-essais réalisés sur des souris, mais elle peut être appliquée aux eaux récréatives ainsi qu'aux eaux de consommation (Costa et al. 2009). La **méthode AOAC 2005.06** (2005) basée sur une identification et une quantification des saxitoxines par HPLC a également été validée comme méthode officielle par l'AOAC International. Cette méthode, validée à l'aide d'une étude comparative réalisée en collaboration avec 18 laboratoires représentant 14 pays différents à travers le monde (Lawrence et al. 2005), est désormais considérée par les Directives de l'Union Européenne (Commission Regulation (EC) N° 1664/2006) comme une méthode alternative officielle à la méthode AOAC 959.08.

Les techniques de lyse cellulaire et d'extraction des saxitoxines varient d'une méthode à une autre en raison des modes de détection et de quantification différentes. Les étapes de lyse cellulaire et d'extraction par solvant préconisée dans la **méthode AOAC 959.08** (2010) sont les suivantes :

- Peser 100 g de fruit de mer ou de biomasse algale dans un bécher préalablement taré;
- Ajouter 100 mL d'acide chlorhydrique (0,1M) puis agiter doucement;
- Contrôler le pH de la solution et s'assurer que le pH est inférieur à 4, idéalement pH=3. Dans le cas contraire, ajuster le pH de la solution;
- Porter la solution à ébullition pendant 5 min puis laisser refroidir la solution à température ambiante;

- Ajuster le pH de la solution entre 2 et 4 en s'assurant de ne pas excéder 4,5 par ajout d'acide chlorhydrique (5 M) ou d'hydroxyde de sodium (0,1 M);
- Compléter le volume de la solution obtenue à 200 mL avec de l'eau déminéralisée puis homogénéiser la solution;
- Laisser décanter jusqu'à ce que le surnageant devienne translucide ou centrifuger à 3 000 rpm pendant 5 min.

Une étude comparative menée sur des moules et des palourdes et réalisée auprès de 31 laboratoires Européens a permis de mettre en évidence l'influence du pH de la solution injectée aux souris lors des bio-essais menés selon la méthode 959.08 (EURLMB 2010). Les résultats obtenus par les différents laboratoires ont montré que les toxicités moyennes mesurées sont significativement plus élevées pour les bio-essais réalisés avec des solutions finales ayant un pH inférieur ou égal à 3, et plus particulièrement pour des échantillons contenant le genre *Gymnodinium* sp. Bien que la méthode officielle AOAC 959.08 préconise l'ajustement du pH final de la solution avant injection entre 2 et 4, cette gamme de pH est une source importante de variabilité des résultats. La conversion des toxines N-sulfocarboyles (GTX5, GTX6, C1, C2) en analogues carbamates plus toxiques (STX, NEO, GTX2, GTX3) à faible pH résulte en une augmentation de la toxicité de l'échantillon ainsi qu'en une variabilité importante des résultats. Afin de réduire la variabilité inter-laboratoire, il est préférable que les laboratoires d'analyse utilisent la même valeur de pH (pH = 3 préconisé). L'ajustement de la valeur du pH à 3 ne permet pas d'empêcher la conversion de certaines toxines en congénères plus toxiques moins observée à pH plus élevé (pH > 3,1), entraînant une surestimation de la toxicité globale comparativement à des pH supérieurs à 3,1 mais il permet cependant de standardiser la méthode d'analyse.

- La méthode AOAC 2005.06 (2005) permet l'analyse des saxitoxines (Gonyautoxines 1-4, GTX1,4 et GTX2,3, Saxitoxines STX, Saxitoxine décarbamoyle dcSTX) présentes dans diverses matrices. Les étapes de préparation recommandées par cette méthode sont les suivantes :
- Peser 1,5 g de biomasse algale ou de toute autre matrice et les placer dans un bécher de 50 mL;
- Ajouter 10 mL d'un mélange eau:MeOH (25:75, v/v) acidifié par HCl (0,2M);
- Homogénéiser pendant 3 min puis centrifuger à 4 500 rpm pendant 10 min;
- Transférer le surnageant dans un tube à centrifugation gradué d'une capacité de 15 mL;

- Nettoyer le bécher de 50 mL avec 10 mL supplémentaire du mélange eau:MeOH puis homogénéiser pendant 30 sec afin de récupérer la totalité des toxines intracellulaires, puis centrifuger à 4 500 rpm pendant 10 min;
- Récupérer le surnageant et le transférer dans le tube à centrifugation de 15 mL puis compléter le volume à 15 mL avec la même solution eau:MeOH.

Selon Chorus et Bartram (1999), les solvants d'extraction recommandés pour la récupération des saxitoxines sont :

- L'acide acétique;
- L'acide chlorhydrique (solvant utilisé par la méthode AOAC 959.08);
- Le MeOH acidifié à l'acide trifluoroacétique (solvant le plus efficace pour l'extraction de la saxitoxine et de la néosaxitoxine);
- Le MeOH acidifié à l'acide chlorhydrique (solvant recommandé par la méthode AOAC 2005.06).

Certains solvants d'extraction peuvent avoir des inconvénients rendant la comparaison des résultats lors d'essais inter-laboratoires difficiles voire impossible. Par exemple, l'utilisation d'acide chlorhydrique lors de l'étape d'extraction peut affecter la toxicité globale de l'échantillon brute (Costa et al. 2009). En effet, il a été démontré que certaines toxines peuvent être converties en congénères plus toxiques durant l'étape d'ébullition en présence d'acide chlorhydrique. Par conséquent, le dosage des saxitoxines par bio-essais (méthode AOAC 959.08) entraîne parfois une surestimation de la toxicité par rapport à l'autre méthode de quantification officielle (méthode AOAC 2005.06).

Le Tableau 5.9 présente les techniques de préparation (extraction et lyse cellulaire) employées par les laboratoires participants pour la détection, l'identification et la quantification des saxitoxines. Les principaux solvants d'extraction utilisés sont l'acide acétique (0,1 M), le MeOH acidifié (acide acétique) ou non, ou l'acide chlorhydrique (0,1 M). Afin de favoriser la lyse cellulaire et par conséquent la solubilisation des saxitoxines, les différents laboratoires préconisent des étapes de lyophilisation (6 laboratoires sur 28), des cycles de congélation-décongélation (9 laboratoires sur 28) ou d'ultrasonication (6 laboratoires sur 28), souvent suivis par des étapes d'extraction, et ensuite des étapes de centrifugation ou de filtration pour séparer les fractions solide et liquide. Le surnageant peut ensuite être analysé pour détecter et quantifier les saxitoxines.

Tableau 5.9 Récapitulatif des méthodes d'extraction et de lyse cellulaire employées dans les laboratoires contactés afin de rompre les parois cellulaires et favoriser la solubilisation des saxitoxines

Pays	**Code Laboratoire**	**Toxines intra- (I) et/ou extra-(E) cellulaires**	**Préparation de l'échantillon**	**Taux de récupération des CT estimé (%)**	**Analyse**
Australie	7	I + E	Ultrasonication à l'aide d'une sonde *Branson* puis dérivation des STX sur précolonne HPLC	n.c.*	HPLC/Fluorescence
Australie	8	I + E	n.c.	n.c.	HPLC/Fluorescence avec dérivation post-colonne
Brésil	11	I + E	Cycle de congélation-décongélation puis ultrasonication suivi par un cycle de congélation-séchage. Extraction à l'acide acétique (500 mM) puis centrifugation	n.c.	ELISA, HPLC/PDA, LC/MS/MS
Bulgarie	12	I + E	n.c.	n.c.	ELISA
Canada	18	I + E	Lyophilisation ou cycle de congélation-décongélation, suivi par des cycles d'extraction au MeOH 75% acidifié à l'acide acétique 0,1% puis sonication	> 90	HILIC/MS/MS
Espagne	20	I + E	Cycle de congélation-décongélation ou de lyophilisation puis 3 cycles de sonication, puis extraction au MeOH acidifié. Évaporation à sec puis reconstitution dans 1 mL de MeOH. Purification on-line sur cartouche *SPE Hypersil Gold C18* (20 x 2,1 mm, 12 µm, *Thermo Fischer Scientific*) en direct lors de l'analyse par HPLC.	> 90	LC/MS ou LC/MS/MS
Espagne	21	I + E	n.c.	n.c.	ELISA, HPLC/PDA, LC/MS
Finlande	24	I	Filtration sur filtre GF/C puis lyophilisation suivi de la pesée de la biomasse, extraction (x3) à l'acide acétique (0,03 M) dans un bain à ultra-sons	Non déterminé	HPLC/ECOS/FLD pour STX, GTX2 et GTX3
France	27	I + E	Extraction au MeOH	n.c.	UHPLC/MS/MS

Pays	Code Laboratoire	Toxines intra- (I) et/ou extra-(E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
France	28	I + E	Lyophilisation ou congélation-décongélation ou ultrasonication	n.c.	ELISA ou HPLC
France	29	I + E	Ultrasonication puis extraction au MeOH	80 - 120	LC/MS
France	35	Toxines liée de façon covalente (analyse encore délicate et problématique)	Extraction au HCl (0,1 M) puis ajustement du pH entre 3 et 4. Ébullition puis ajustement du pH entre 2 et 4	Taux de récupération convenable si entre 80 et 120	Bio-essais sur souris
France	37	E	Filtration sur fibre de verre de 1,2 µm, puis extraction en présence de MeOH	n.c.	LC/MS/MS
Japon	50	I	Ultrasonication puis extraction en présence de HCl ou d'acide acétique	n.c.	ELISA; LC/MS
Norvège	55	I + E	Cycle de congélation-décongélation	n.c.	ELISA
Nouvelle-Zélande	56	I + E	Lyophilisation en combinaison avec ultrasonication pendant l'étape de séchage (x3 généralement)	n.c.	ELISA
Nouvelle-Zélande	59	n.c.	n.c.	n.c.	ELISA : détection rapide
Pays-Bas	61	I + E (occasionnel)	n.c.	n.c.	LC/MS/MS
Pologne	65	I + E	Sonication à l'aide d'un bain à ultra-sons puis à l'aide d'une sonde à ultra-sons. Extraction en présence de MeOH ou d'acétonitrile	n.c.	ELISA, HPLC-PDA, LC/MS/MS
USA	81	n.c.	n.c.	n.c.	ELISA
USA	82	I + E	Extraction en présence de d'acide acétique (0,1 M)	n.c.	ELISA ou LC/Fluorescence
USA	83	n.c.	n.c.	n.c.	ELISA
USA	84	I + E	3 cycles de congélation-décongélation puis filtration sur 0,45 µm	n.c.	ELISA, LC/MS/MS
USA	85	I + E	Cycle de congélation-décongélation (x3)	n.c.	LC/MS/MS
USA	86	I + E	Ultrasonication puis extraction au MeOH acidifié (acide trifluoroacétique)	n.c.	ELISA, HPLC-UV, HPLC-PDA

Pays	Code Laboratoire	Toxines intra- (I) et/ou extra-(E) cellulaires	Préparation de l'échantillon	Taux de récupération des CT estimé (%)	Analyse
USA	89	n.c.	Sonication puis extraction en présence de MeOH 50%	> 90	HPLC après dérivation fluorescence
USA	90	I + E	n.c.	n.c.	ELISA
USA	93	I + E	n.c.	n.c.	HPLC/Fluorescence - Dérivation post-colonne

**n.c. : non communiqué.*

5.2.3 Purification des échantillons pour l'analyse des toxines intracellulaires et extracellulaires

La concentration en toxines extracellulaires dans l'échantillon d'eau brute est souvent trop faible pour être analysée directement. Une étape de concentration et de purification de l'échantillon est donc recommandée. Cette étape permet l'élimination des impuretés présentes dans l'échantillon d'eau à analyser et favorise la concentration des cyanotoxines dans un plus petit volume de solvant. Sans cette étape de purification et de concentration, la quantification des cyanotoxines extra-cellulaires par les méthodes chromatographiques s'avère très complexe. En effet, certaines toxines peuvent être masquées par des contaminants qui éluent simultanément, ou la concentration en toxines peut être surestimée si les composés ne sont pas suffisamment bien séparés de la matrice. L'étape de concentration et de purification des échantillons se fait sur des cartouches d'extraction en phase solide (solid-phase extraction : SPE).

La concentration et la purification simultanée de toutes les cyanotoxines (microcystines, nodularines, anatoxines, cylindrospermopsine) est un véritable challenge en raison des différences importantes de structures des cyanotoxines. En effet, la cylindrospermopsine est un composé très hydrophile qui possède une charge positive et une charge négative à pH neutre (pH des eaux récréatives et de consommation), l'anatoxine-a est un composé hydrophile qui possède une charge positive à pH neutre, alors que les microcystines sont des composés lipophiles qui possèdent deux charges négatives et une charge positive à pH neutre. Le choix de la cartouche utilisée pour la concentration et la purification des échantillons dépend donc du type de cyanotoxines à analyser (Meriluoto et Spoof 2008) :

- Microcystines et nodularines : cartouche d'extraction en phase inverse (cartouche SPE de type C18), matériau polymérique ou cartouche d'immunoaffinité;
- Anatoxine-a : cartouche d'extraction en phase inverse (cartouche SPE de type C18) ou adsorbant faiblement cationique;
- Cylindrospermopsine : cartouche d'extraction SPE carbone.

Plusieurs protocoles ont été mis en place afin de purifier les échantillons contenant les cyanotoxines, facilitant ainsi l'analyse par les méthodes immunologiques (recommandé pour les toxines extra-cellulaires) ou chromatographiques. Les gels de silice greffés par des groupements fonctionnels octadécyle (C18) sont fortement employés par les laboratoires d'analyse pour la purification et la concentration des microcystines, des nodularines et de l'anatoxine-a car ils permettent une bonne fixation des toxines tout en laissant passer les interférents (contaminants) à travers la cartouche (Chorus et Bartram 1999). Plus récemment, des cartouches d'immunoaffinité ont été développées permettant de concentrer et de purifier les cyanotoxines présentes dans des échantillons d'eau ou des matrices complexes. Selon Meriluoto et Spoof (2008), les cartouches d'immunoaffinité sont plus efficaces que les cartouches d'extraction sur phase solide de type SPE greffée C18 pour concentrer et purifier les toxines extracellulaires contenues dans les échantillons d'eaux ou les matrices complexes.

5.2.3.1 Anatoxine-a

À ce jour, il n'existe aucun protocole International (norme ISO) pour la préparation et le dosage de l'anatoxine-a, de l'anatoxine-a(S) ou de l'homo-anatoxine.

Au niveau Européen, le protocole opératoire standard établi par Metcalf et Codd (2005b) (SOP_TOXIC_UDU_04F) préconise les étapes suivantes pour favoriser la récupération de l'anatoxine-a intracellulaire:

- Ajuster le pH de l'échantillon d'eau (préalablement filtré selon le protocole SOP_TOXIC_UDU_02F présenté dans la section 4.2.1) à 9,6 par ajout d'hydroxyde de sodium;
- Conditionner la cartouche SPE C18 (par ex. Isolute C18, 1g, 6mL) en présence de 10 mL d'une solution de MeOH contenant 0,1% de TFA (v/v);
- Appliquer l'échantillon sur la cartouche en prenant garde de ne pas sécher la cartouche durant le conditionnement ou l'application de l'échantillon;

- Sécher la cartouche en laissant passer de l'air à travers la cartouche;
- Éluer la cartouche par ajout de 3 mL d'une solution de MeOH contenant 0,1% de TFA et collecter l'éluat dans un contenant borosilicaté;
- Évaporer le solvant à 50°C sous argon ou sous N2;
- Reprendre le résidu dans 500 µL d'eau Milli-Q;
- Centrifuger à 10 000 g pendant 10 min puis récolter le surnageant pour analyse.

En Afrique du Sud, le manuel regroupant les méthodes d'échantillonnage, de détection et d'identification et de quantification des cyanotoxines (microcystines, anatoxine-a et cylindrospermopsine) établi par Swanepoel et al. (2008) préconise les étapes suivantes de purification des échantillons:

- Ajuster le pH de l'échantillon d'eau entre 6,0 et 8,0 par ajout d'acide acétique 1% (v/v) ou d'hydroxyde d'ammonium respectivement afin d'éviter toute perte d'anatoxine-a;
- Ajouter 10 mL de MeOH puis agiter efficacement;
- Laisser la solution décanter pendant 5 min;
- Conditionner la cartouche SPE C18 par ajout de 4 mL de MeOH puis 4 mL d'eau déminéralisée à un débit de 10 $mL.min^{-1}$ en s'assurant de ne pas sécher la cartouche;
- Appliquer l'échantillon sur la cartouche à un débit de 10 $mL.min^{-1}$;
- Éluer la cartouche par 3 ajouts successifs de 1 000 µL de MeOH (laisser le solvant tremper la cartouche pendant 1 min) et collecter chaque éluat dans des tubes;
- Évaporer le MeOH à 40°C sous N2 puis reprendre le résidu dans 500 µL d'une solution MeOH:eau Milli-Q (50:50, v/v);
- Soniquer l'extrait pendant 5 min avant analyse par HPLC.

Selon James et al. (1998), l'utilisation d'une cartouche de concentration et de purification faiblement cationique de type WCX (3 mL, Supelco) s'avère très efficace pour la récupération de l'anatoxine-a, de l'homoanatoxine-a et de leurs produits de dégradation. Les auteurs préconisent d'ajuster le pH de la solution à 7,0 avant l'étape de purification sur cartouche faiblement cationique afin d'améliorer la récupération de l'anatoxine-a et de ses produits de dégradation (pourcentages de récupération compris entre 83,2 et 84,9%) pour une concentration initiale de 10 $µg.L^{-1}$. L'utilisation de ce type de cartouche

offre une bonne répétabilité de la méthode de préparation des échantillons avec un écart-type résiduel compris entre 1,7 et 3,9% (n = 8). Rawn et al. (2005) ont quant-à-eux observé une faible rétention de l'anatoxine-a sur les cartouches d'échange faiblement cationique (WCX), entraînant ainsi des risques de pertes de cette toxine et par conséquent une sous-estimation de la teneur en anatoxine-a. Selon les auteurs, l'utilisation de cartouches SPE de type C18 permettent de purifier suffisament l'extrait pour une identification de l'anatoxine-a même si des composés peuvent parfois co-éluer. L'addition de o-phtaldialdéhyde et de mercaptoéthanol à l'extrait avant l'étape de dérivation par ajout de 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole facilite l'enlèvement des amines primaires présentes dans l'échantillon d'eau brute, réduisant ainsi le bruit de fond lors de l'analyse de l'anatoxine-a par fluorescence. L'étape de dérivation sera présentée dans la section 4.3.4.

Parmi les 33 laboratoires analysant l'anatoxine-a contactés et ayant répondus à l'enquête, 11 laboratoires réalisent une étape de concentration et de purification de l'échantillon sur cartouche SPE de type C18 (*Hypersil Gold, ThermoFisher*; C18, Waters), de type polymérique (*Strata X, Phenomenex*) ou de type zwitterionique (*ZIC-HILIC, Merck*) (Tableau 5.10).

Tableau 5.10 Récapitulatif des méthodes de purification et de concentration utilisées dans les laboratoires contactés afin de favoriser l'analyse de l'anatoxine-a et/ou de l'homoanatoxine-a

Pays	Code Laboratoire	Cartouche d'extraction	Conditionnement	Rinçage	Élution	Étapes suivantes
Argentine	3	Aucune	-	-	-	-
Australie	7	n.c.*	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Australie	8	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Canada	16	*SPE Water Oasis HLB*	Sonication puis purification sur cartouche au MeOH puis	n.c.	MeOH	Évaporation à sec et dérivation à l'anhydride trifluoroacétique à 95°C et ajout de 100 µL d'éthylacétate
Canada	17	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Canada	18	Aucune	-	-	-	-
Espagne	20	Purification on-line sur cartouche SPE *Hypersil Gold* C18 (20 x 2,1 mm, 12 µm, *Thermo Fischer*) en direct lors de l'analyse par HPLC	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Espagne	21	Aucune	-	-	-	-
France	27	Aucune	-	-	-	-
France	28	Cartouche SPE (C18 *Chromabond*)	MeOH puis Eau	Eau acidifiée	MeOH 20%	Évaporation à sec puis reprise dans 1 mL d'eau
France	29	Cartouche SPE (*Waters*)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
France	37	Aucune	-	-	-	-
Grèce	43	Cartouche SPE *Oasis HLB* ou C18	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Italie	49	Aucune	-	-	-	-
Japon	50	Aucune	-	-	-	-
Luxembourg	52	Aucune	-	-	-	-
Nouvelle-Zélande	56	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

Pays	Code Laboratoire	Cartouche d'extraction	Conditionnement	Rinçage	Élution	Étapes suivantes
Pays-Bas	62	Cartouche SPE (ZIC-HILIC, 500 mg, 3 mL, *Merck*)	Acétonitrile 10% (0,1% acide formique) puis Acétonitrile 95% (0,1% acide formique)	n.c.	Acétonitrile 10% acidifié (0,1% acide formique)	Évaporation puis reprise dans 800 µL d'eau acidifiée (0,1% acide formique)
Pologne	65	Aucune	-	-	-	-
Portugal	66	Cartouche SPE (*Tecnocroma*)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Taïwan	75	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	79	Aucune	-	-	-	-
USA	80	Aucune	-	-	-	-
USA	81	Aucune	-	-	-	-
USA	82	Cartouche Strata X	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	83	Aucune	-	-	-	-
USA	84	Aucune	-	-	-	-
USA	85	Aucune	-	-	-	-
USA	88	Aucune	-	-	-	-
USA	89	Aucune	-	-	-	-
USA	90	Aucune	-	-	-	-
USA	91	Cartouche SPE faiblement cationique	n.c.	n.c.	n.c.	Évaporation sous N_2 puis conservation à -20°C jusqu'à l'analyse. Dérivation par ajout de 4-fluoro-7-nitro2,1,3-benzoxidiazole puis centrifugation
USA	93	Cartouche faiblement cationique (WCX, 3 mL, *Supelco*)	MeOH (6 mL) puis eau (6 mL)	MeOH 50% (3 mL)	MeOH acidifié à 0,02% avec TFA	Évaporation du solvant à 50°C sous N_2. Reconstitution des échantillons dans du borate de sodium (0,1M - 100 µL). Dérivation par ajout de 50 µL de 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoadiazole (1 mg/mL dans ACN) dans le noir
USA	94	Aucune	-	-	-	-

**n.c. : non communiqué.*

5.2.3.2 BMMA

À ce jour, il n'existe aucun protocole standard défini au niveau International (norme ISO) ou National décrivant les étapes de purification et/ou de concentration sur cartouche SPE à réaliser pour la détection et la quantification de la ß-N-méthylamino-L-alamine (BMAA).

Des études récentes ont montré que la purification et la concentration de la BMAA sur des cartouches SPE est favorable, simple et efficace pour de petits volumes d'échantillons (50 mL et moins) (Kubo et al. 2008, Li et al. 2010). Les auteurs de ces études ont testé différentes cartouches d'extraction SPE de type C18 (*Sep-pack C18*), cationique (*Oasis MCX, Waters*) et hydrophobique (*Oasis HLB, Waters*). Selon Kubo et al. (2008), les cartouches d'extraction SPE de type C18 ou hydrophobiques ne sont pas optimales pour la détection et la quantification de la BMAA, alors que les cartouches d'extraction cationiques semblent plus adéquates. En effet, la BMAA ne semble pas ou peu s'adsorber sur les groupements fonctionnels des cartouches d'extration SPE de type C18 et hydrophobiques, puisqu'une portion importante de cette toxine a été retrouvée à la fois dans les fractions des étapes de percolation et de rinçage. Concernant la cartouche d'extraction cationique testée, la fixation de la BMAA sur les groupements fonctionnels de la cartouche semble plus efficace, car aucune trace de BMMA n'a été détectée dans les fractions des étapes de percolation et de rinçage. Selon l'étude réalisée par Li et al. (2010), la purification et la concentration de la BMAA sur une cartouche d'extraction cationique (*Oasis MCX, Waters*) semble très efficace (taux de récupération de plus de 80%). Les auteurs de l'étude préconisent une étape de rinçage de la cartouche en présence d'acide chlorhydrique (0,1 M) et de MeOH afin d'éluer les impuretés, suivie par une élution de la BMAA à l'aide d'une solution de carbonate d'ammonium $(NH_4)_2CO_3$ (1 M). Ces étapes de rinçage et d'élution favorisent la détection et la quantification de la BMAA par LC-ESI-MS.

À travers ces différentes études, il est possible d'observer que ces étapes de purification et de concentration de la BMAA sur cartouche SPE peuvent être plus ou moins efficaces en fonction des conditions d'extraction utilisées (solution d'extraction et pH de la solution), ainsi que de la présence d'autres molécules pouvant compétitionner la BMAA pour les sites de fixation. Il est par conséquent important de sélectionner la cartouche de purification et de concentration en fonction de ses propriétés (groupements fonctionnels) et de sa spécifité pour la BMAA. Esterhuizer et Dowing (2011) ont étudié les capacités de la cartouche *StrataX-C* pour la purification et la concentration de la BMAA présente dans de plus grands volumes d'échantillon (1 L). Les auteurs ont mis en évidence que la colonne *StrataX-C* n'est

pas idéale pour la purification des échantillons contenant à la fois de la BMAA et une forte concentration en acides aminés avec un taux de récupération estimé à 57%, ainsi que pour les échantillons d'eau de mer, avec un taux de récupération estimé à 63%. Dans le cas des échantillons chargés en acides aminés, les auteurs présument que les acides aminés les plus protonés à un pH donné, forment des liaisons très fortes avec les groupements sulfoniques de la cartouche de purification, entraînant une perte de la BMAA lors de la percolation de l'échantillon ainsi que la nécessité d'utiliser des solvants organiques forts pour l'étape de rinçage qui peuvent également favoriser son élution. Considérant le pKa de la BMAA, les auteurs préconisent d'acidifier l'échantillon avant l'étape de purification et de concentration sur cartouche SPE afin de s'assurer que les groupements amines et la fonction acide de la BMAA seront protonés, favorisant ainsi la fixation de la BMAA à la résine. Pour ce qui est des échantillons d'eau de mer, les auteurs mettent en évidence que la présence de NaCl dans l'échantillon pourrait être à l'origine du faible de taux de récupération observé. En effet, les ions Na^+ peuvent compétitionner la BMAA pour les sites de fixation de la cartouche SPE, qui possèdent une plus forte affinité pour les ions Na^+ que pour les groupements protonés de la BMAA. Par conséquent, les auteurs ne recommandent pas l'utilisation de cartouche StrataX-C pour la purification et la concentration d'eaux chargées en acides aminés et d'eau de mer. Ces cartouches peuvent cependant être utilisées pour la purification et la concentration d'eau en vue de la détection et de la quantification de la BMAA par LC/MS après dérivation à l'aide d'un kit *EZ:faast*^{TM} pour l'analyse des acides aminés (*Phenomenex KH0-7338*) (Esterhuizer et Dowing 2011).

Parmi les sept laboratoires réalisant l'analyse de la BMAA dans les échantillons d'eaux récréatives ou de consommation, seulement deux laboratoires réalisent une étape de purification et concentration sur cartouche SPE de type C18 (*C18, Oasis HLB*) ou fortement cationique (*Isolute HCX-3*) (Tableau 5.11).

Tableau 5.11 Récapitulatif des méthodes de purification et de concentration utilisées dans les laboratoires contactés afin de favoriser l'analyse de la BMAA

Pays	Code Laboratoire	Cartouche d'extraction	Conditionnement	Rinçage	Élution	Étapes suivantes
Canada	17	Aucune	-	-	-	-
Grèce	43	Cartouche SPE *Oasis HLB* ou *C18*	n.c.*	n.c.	n.c.	n.c.
Pays-Bas	62	Aucune	-	-	-	-
Pologne	65	Aucune	-	-	-	-
Suéde	72	Cartouche *Isolute HCX-3* (100 mg)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	82	Aucune	-	-	-	-
USA	89	Aucune	-	-	-	-

**n.c. : non communiqué.*

5.2.3.3 Cylindrospermopsine

À ce jour, il n'existe aucun protocole International (norme ISO) pour la préparation et le dosage de la cylindrospermopsine ou de la 7-épicylindrospermopsine.

Au niveau Européen, le protocole opératoire standard établi par Metcalf et Codd (2005c) (SOP_TOXIC_UDU_05F) préconise les étapes suivantes pour favoriser la récupération de la cylindrospermopsine intracellulaire:

- Ajuster le pH de l'échantillon d'eau (préalablement filtré selon le protocole SOP_TOXIC_UDU_02F présenté dans la section 4.2.1) à 9,6 par ajout d'hydroxyde de sodium;
- Préparer un système permettant de combiner une cartouche SPE C18 (par ex. *Isolute C18*, 1 g, 6 mL) à une cartouche en carbone de polygraphite PGC (par ex. *Hypercarb*, 200 mg, 3 mL);
- Conditionner les cartouches en présence de 10 mL d'une solution de MeOH contenant 0,1% TFA (v/v) suivi par 10 mL d'eau;
- Appliquer l'échantillon sur la cartouche en prenant garde de ne pas sécher la cartouche durant le conditionnement ou l'application de l'échantillon;
- Sécher la cartouche PGC en laissant passer de l'air à travers la cartouche;
- Éluer la cartouche par ajout de 3 mL d'une solution de MeOH contenant 0,1% de TFA et collecter l'éluat dans un contenant borosilicaté;
- Évaporer le solvant à 50°C sous argon ou sous N2;

- Reprendre le résidu dans 500 µL d'eau *Milli-Q*;
- Centrifuger à 10 000 x *g* pendant 10 min puis récolter le surnageant pour analyse.

En Afrique du Sud, le manuel regroupant les méthodes d'échantillonnage, de détection et d'identification et de quantification des cyanotoxines (microcystines, anatoxine-a et cylindrospermopsine) établi par Swanepoel et al. (2008) préconise les mêmes étapes de purification des échantillons que celles réalisées pour l'anatoxine-a.

Selon Bogialli et al. (2006), la cylindrospermopsine est un composé fortement polaire qui s'adsorbe facilement sur les cartouches de purification. Les auteurs préconisent donc de ne pas réaliser d'étapes de purification et d'injecter directement l'échantillon après l'ajout de 15 µL de 1,9-diaminononane (étalon interne). Parmi les 37 laboratoires contactés, ayant répondus à l'enquête et analysant la cylindrospermopsine, 15 réalisent une étape de concentration et de purification de l'échantillon sur cartouche SPE de type C18 (*C18, Waters; SulpelcleanTM LC-18, Supelco*), de type polymérique (*InertSep RP-1, GLScience*), de type SPE Carbone (*Bond Elut Carbon, Varian; SupelcleanTM ENVITM, Sulpelco; Carbograph*) ou de type zwitterionique (*ZIC-HILIC, Merck*) (Tableau 5.12) ou une colonne d'ultrafiltration (*Vecta Spin, Whatman*).

Tableau 5.12 Récapitulatif des méthodes de purification et de concentration utilisées dans les laboratoires contactés afin de favoriser l'analyse de la cylindrospermopsine et/ou de la déoxycylindrospermopsine

Pays	Code Laboratoire	Cartouche d'extraction	Conditionnement	Rinçage	Élution	Étapes suivantes
Australie	7	Aucune	-	-	-	-
Australie	8	n.c.*	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Brésil	11	Aucune	-	-	-	-
Canada	18	Aucune	-	-	-	-
Espagne	20	Aucune	-	-	-	-
Espagne	21	Cartouche Carbone Graphitisé *Bond Elut Carbon* (500 mg, *Varian*)	Eau	-	$MeOH:CH_2Cl_2$ (4:1) acidifié à l'acide formique 5%	n.c.
France	27	Aucune	-	-	-	-
France	28	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
France	29	Cartouche SPE (*Waters*)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
France	37	Aucune	-	-	-	-
Grèce	43	Cartouche SPE *Oasis HLB* ou *C18*	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Grèce	44	Aucune	-	-	-	-
Grèce	45	Aucune	-	-	-	-
Israël	48	Colonne ultrafiltration (*Vecta Spin, Whatman*)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Italie	49	Aucune	-	-	-	-
Japon	50	Cartouche *InertSep RP-1* (*GLScience*, Tokyo, Japon) et *OASIS MAX*	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Norvège	55	Aucune	-	-	-	-
Nouvelle-Zélande	56	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Pays-Bas	62	Cartouche *SPE ZIC-HILIC* (500 mg, 3 mL, *Merck*)	Acétonitrile 10% acidifié à l'acide formique (0,1%) puis acétonitrile 95%acidifié à l'acide formique (0,1%)	-	Acétonitrile 10% acidifié à l'acide formique (0,1%)	Évaporation puis reprise dans 800 µL eau acidifiée (0,1% acide formique)

Pays	Code Laboratoire	Cartouche d'extraction	Conditionnement	Rinçage	Élution	Étapes suivantes
Pologne	65	Aucune	-	-	-	-
Portugal	66	Cartouche SPE (*Tecnocroma*)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
République Tchèque	67	Tamdem de cartouches *SPE C18* et *ENVI-Carb Supelclean*	MeOH (5 mL) puis eau (5 mL)	-	MeOH acidifié à l'aide de TFA (0,1%)	n.c.
Slovaquie	69	Cartouche SPE *SupelcleanTM LC-18 SPE Tubes* et *SupelcleanTM ENVITM - Carb SPE Tubes* (3 mL, *Supelco*)	MeOH (5 mL) puis eau acidifiée à pH 6 (5 mL)	-	MeOH 50% acidifié à l'aide de TFA (0,1%) (5 mL)	Évaporation puis reprise dans 400 µL de MeOH (50%)
Sri Lanka	71	Cartouche *SPE LiChrolut® RP-18*	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	79	Aucune	-	-	-	-
USA	80	Aucune	-	-	-	-
USA	81	Aucune	-	-	-	-
USA	82	Cartouche *Carbograph*	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	83	Aucune	-	-	-	-
USA	84	Aucune	-	-	-	-
USA	85	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	86	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	88	Aucune	-	-	-	-
USA	89	Aucune	-	-	-	-
USA	90	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	92	Aucune	-	-	-	-
USA	93	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

**n.c. : non communiqué.*

5.2.3.4 Microcystines

Au niveau International, la norme ISO 20 179 : 2005 décrit les étapes suivantes afin de favoriser la purification des échantillons en vue de l'analyse des microcystines (MC-LR, MC-RR et MC-YR) :

- Sélectionner des cartouches d'extraction ayant les spécifications suivantes : la capacité minimale des cartouches doit être de 100 µg pour chaque microcystine et la récupération des toxines ne

doit pas être inférieure à 80% pour la MC-LR et à 70% pour les MC-RR et MC-YR lors de la purification d'une solution standard d'eau contenant 0,05 µg de chaque microcystine. Pour ce faire, la cartouche sélectionnée doit avoir les caractéristiques suivantes : quantité de carbone (16,9%), diamètre des particules (54 µm), surface spécifique (333 $µg.m^{-2}$ basé sur le pourcentage de carbone), volume de cartouche (3 mL), quantité d'adsorbant (500 mg);

- Conditionner les cartouches d'extraction selon les recommandations du fabricant. S'il n'y a aucune recommandation, passer 4 mL de MeOH à travers la cartouche puis passer 4 mL d'eau à un débit inférieur à 10 $mL.min^{-1}$ en s'assurant de ne pas assécher la cartouche;
- Appliquer l'échantillon extrait de microcystines sur le haut de la cartouche conditionnée. Rincer le vial d'extraction avec 500 µL d'une solution aqueuse de MeOH à 20%, puis appliquer les 500 µL sur le haut de la cartouche;
- Une fois que le liquide est passé à travers la cartouche, rincer la cartouche avec 4 mL de la solution de MeOH et jeter le liquide récupéré en sortie de cartouche;
- Éluer la cartouche selon les recommandations du fournisseur. Sinon éluer les microcystines fixées avec 2 mL de solution d'élution SPE (MeOH:eau contenant 0,1% TFA – 90:10, v/v) puis récupérer la fraction éluée dans un vial d'une capacité de 4 mL;
- Évaporer la fraction éluée à sec sous un jet d'azote (40°C) puis reprendre dans 500 µL de solution aqueuse de MeOH à 20% puis soniquer dans un bain à ultrasons pendant 5 min;
- Si une dilution de l'échantillon est nécessaire, diluer 100 µL de l'échantillon extrait dans 900 µL de la solution de MeOH.

Si la purification sur cartouche ne permet pas de réduire la co-élution des contaminants, une chromatographie d'exclusion stérique, une purification sur cartouche d'immunoaffinité ou sur un matériel polymérique peut être utilisée comme alternative.

Au niveau Européen, le protocole opératoire standard établi par Meriluoto et Spoof (2005c) (SOP_TOXIC_AAU_05F) préconise les étapes suivantes pour favoriser la purification des échantillons:

- Mesurer le pH de l'échantillon d'eau brute et l'ajuster si nécessaire entre 5 et 8 par ajout de solutions de NH_4OH ou de TFA diluées;

- Pour les échantillons d'eau chlorés, ajouter 500 µL d'une solution de thiosulfate de sodium (0,1 g.L^{-1}) à 500 mL d'échantillon d'eau puis secouer vigoureusement avant de laisser reposer pendant 5 min;
- Ajouter 5 mL de MeOH pur et agiter efficacement;
- Conditionner la cartouche de purification (*Isolute C18*, 1 g, 6 mL, *Arganult Technologies*) avec 10 mL de MeOH pur suivi par 10 mL d'eau. Ne jamais laisser la cartouche s'assécher lors des étapes de conditionnement, d'application de l'échantillon et lavage;
- Appliquer l'échantillon avec un débit de 10 mL.min^{-1};
- Laver la cartouche avec 4 mL d'une solution aqueuse de MeOH à 20% puis sécher la cartouche en faisant passer de l'air à travers pendant 2 min;
- Éluer les microcystines par ajout de 4 mL d'une solution d'acétonitrile contenant 0,5% de TFA et récupérer l'éluat dans des tubes en verre borosilicaté (12 mm x 75 mm). Il est préférable d'ajouter le MeOH en deux fractions séparées de 2 mL, de laisser le solvant en contact avec la cartouche pendant 3 min puis d'ajouter les 2 mL restant. Le débit d'élution ne doit pas excéder 4 mL.min^{-1};
- Évaporer la fraction éluée à sec sous un jet d'azote ou d'argon (50°C) puis reprendre dans 500 µL de solution aqueuse de MeOH à 75%;
- Centrifuger pendant 10 min à 10 000 x g ou filtrer l'échantillon avant de le transférer dans un vial pour analyse HPLC.

En Afrique du Sud, le manuel regroupant les méthodes d'échantillonnage, de détection et d'identification et de quantification des cyanotoxines (microcystines, anatoxine-a et cylindrospermopsine) établi par Swanepoel et al. (2008) préconise les mêmes étapes de purification des échantillons que celles présentées dans le cas de l'anatoxine-a.

Selon Chorus et Bartram (1999), les étapes d'extraction recommandées pour favoriser la récupération des microcystines sont:

- Pour les échantillons d'eau chlorés, ajouter 0,1 mL d'une solution de thiosulfate de sodium (0,1 g.L^{-1}) à 500 mL d'échantillon d'eau puis secouer vigoureusement avant de laisser reposer pendant quelques min;

- Ajouter 5 mL de MeOH pur et agiter efficacement;
- Conditionner la cartouche de purification avec 10 mL de MeOH suivi par 10 mL d'eau. Ne jamais laisser la cartouche s'assécher lors des étapes de conditionnement, d'application de l'échantillon et lavage. Les éluats peuvent être jetés;
- Appliquer l'échantillon sur la cartouche SPE;
- Laver la cartouche avec 10 mL d'une solution aqueuse de MeOH à 10%, puis avec 10 mL d'une solution de MeOH à 20% et 10 mL d'une solution de MeOH à 30%. Les éluats peuvent être jetés;
- Éluer les microcystines par ajout de 3 mL de MeOH acidifié à 0,1% par du TFA et récolter l'éluat dans un tube;
- Évaporer la fraction éluée à sec sous un jet d'azote (45°C) puis reprendre dans 0,1 mL de MeOH et les transférer dans un tube à centrifugation. Le tube précédent est de nouveau rincé avec 0,1 mL de MeOH et transféré dans le tube à centrifugation;
- Analyser l'échantillon ou le sécher avant de le conserver au congélateur jusqu'à l'analyse.
- Les auteurs recommandent de réaliser cette procédure en duplicatas pour chaque échantillon devant être analysé afin de confirmer la justesse des résultats.

Des essais préliminaires ont été réalisés par Meriluoto et Spoof (2008) afin de concentrer et purifier simultanément toutes les cyanotoxines sur une cartouche d'extraction *Water Oasis MCX 3* (adsorbant polymérique mixte, 60 mg, *Waters*). Les auteurs ont observé une bonne récupération des cyanotoxines (supérieure à 75% pour l'anatoxine-a, la cylindrospermopsine, la nodularine et les microcystines : MC-LR, MC-RR, MC-LF et MC-LW) en procédant de la méthode suivante: après activation de la cartouche (2 mL MeOH + 2 mL eau), puis ajout de l'échantillon contenant des microcystines (MC-LR, MC-RR, MC-YR), de l'anatoxine-a et de la cylindrospermopsine, rinçage de la cartouche et d'une élution en présence d'une solution de MeOH et d'eau contenant 0,3 $g.mL^{-1}$ de $CaCl_2$ (80/20), évaporation sous azote à 50°C, récupération des cyanotoxines dans une solution de MeOH à 30% puis analyse par HPLC-UV. Les auteurs soulignent cependant une plus faible récupération de la cylindrospermopsine si le volume d'eau brute à analyser est trop grand.

Selon Aguete et al. (2003), la concentration et la purification des échantillons contenant des microcystines (MC-LR, MC-RR et MC-YR) est plus efficace lors de l'utilisation de cartouches d'immunoaffinité (*Microcystin ImmunoSepTM, ImmuniKem Ltd*) que lors de l'utilisation de cartouches SPE de type C18 (*BakerBond Octadecyl, Baker*). En effet, les résultats obtenus indiquent des taux de récupération compris entre 80 et 100% lors de l'utilisation de cartouche immunoaffinité pour l'ensemble des microcystines utilisées, contre seulement 60 à 83% lors de l'utilisation de cartouche SPE de type C18. La répétabilité de la méthode de préparation des échantillons semble également meilleure lorsque l'étape de purification est réalisée à l'aide de cartouche immunoaffinité (coefficient de variation : 3,7 – 9,9%) comparativement aux cartouches SPE C18 (coefficient de variation : 8,7 – 12,9%).

Parmi les 78 laboratoires contactés, ayant répondus à l'enquête et analysant les microcystines, 38 réalisent une étape de concentration et de purification de l'échantillon sur cartouche SPE de type C18 (*Hypersil Gold, ThermoFisher; C18, Waters; Lichrolut Rp-18, Merck; Strata X 33µm C-18, Phenomenex; Bakerbond SPE, Krakeler; Chromabond C18ec , Macherey-Nagel; Isolute C18, Biotage; C18 Bond Elut, Agilent; Sulpelclean™ LC-18, Supelco*), de type SPE Carbone (*Supelclean™ ENVITM, Sulpelco*) ou de type SPE phase inverse (*Oasis HLB, Waters*), de type polyétersulfane (PES), de type polymérique (co-polymère de N-vinyl-pyrrodione et de divynilbenzène) (Tableau 5.13) ou une cartouche d'immunoaffinité.

Tableau 5.13 Récapitulatif des méthodes de purification et de concentration utilisées dans les laboratoires contactés afin de favoriser l'analyse des microcystines et nodularines (d'après les réponses aux questionnaires)

Pays	Code Laboratoire	Cartouche d'extraction	Conditionnement	Rinçage	Élution	Étapes suivantes
Afrique du Sud	1	Aucune	-	-	-	-
Allemagne	2	Aucune	-	-	-	-
Argentine	3	Cartouche *LiChrolut RP-18* (500 mg, *Merck*)	MeOH (10 mL) puis acide acétique 5% (10 mL)	MeOH à 10, 20 et 30%	MeOH à 100% (3 mL)	Évaporation de l'éluat à sec à 40°C et 0,3 Torr puis récupération dans 200 µL de MeOH
Australie	7	Cartouche SPE - purification en ligne	n.c.*	n.c.	n.c.	n.c.
Australie	8	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Autriche	10	Aucune	-	-	-	-
Brésil	11	Cartouche *Strata-X 33µ - C18* (6 mL)	MeOH 20% (20 mL) puis eau (20 mL)	Eau (20 mL)	MeOH à 100% (40 mL)	Évaporation de l'échantillon puis récupération dans 1 mL de MeOH (50%)
Bulgarie	12	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Canada	13	Cartouche C18	MeOH (5 mL) puis eau (5 mL)	Eau (5 mL)	MeOH acidifié TFA (0,75%)	Évaporation de l'échantillon à 26°C sous argon puis récupération dans du MeOH (40%)
Canada	16	Cartouche *Water Oasis HLB*	n.c.	n.c.	MeOH	n.c.
Canada	17	Cartouche PES (Polyéthersulfane)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Canada	18	Aucune	-	-	-	-
Danemark	19	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Espagne	20	Cartouche SPE *Hypersil Gold C18* (20 x 2,1 mm, 12 µm, *Thermo Fischer*) en direct	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

Pays	Code Laboratoire	Cartouche d'extraction	Conditionnement	Rinçage	Élution	Étapes suivantes
Espagne	21	Aucune	-	-	-	-
Estonie	23	*Cartouche OASIS HLB* (6 mg, Waters)	n.c.	MeOH à 5%	MeOH à 75%	n.c.
Finlande	24	Aucune	-	-	-	-
France	26	Cartouche SPE et élution acétonitrile	n.c.	n.c.	Acétonitrile	n.c.
France	27	Cartouches de 6 mL contenant 200 mg d'un copolymère de N-vinyl-pyrrolidone et de divinyl-benzène	MCs > 70%	MCs: HPLC/MS	Mélange MeOH : eau (90 : 10) acidifié à l'acide formique (0,1%) (2,5 mL)	n.c.
France	28	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
France	29	Cartouche SPE (*Waters*)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
France	30	Aucune	-	-	-	-
France	31	Cartouche C18 *Bakerbond SPD* (3 mL - 200 mg)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
France	32	Aucune	-	-	-	-
France	33	Aucune	-	-	-	-
France	34	Aucune	-	-	-	-
France	35	Aucune	-	-	-	-
France	36	Aucune	-	-	-	-
France	37	Aucune	-	-	-	-
Grèce	43	Cartouche SPE *Oasis HLB* ou *C18*	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Grèce	44	Cartouche SPE (*Varian*)	MeOH (5 mL) puis Eau MilliQ (10 mL)	n.c.	MeOH à 30% (5 mL)	n.c.
Grèce	45	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Hongrie	46	Cartouche SPE C18	MeOH puis eau MilliQ	MeOH à 20%	MeOH à 90%	Évaporation sous N_2 à 40°C puis récupération dans 500 µL de MeOH (20%)
Inde	47	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

Pays	Code Laboratoire	Cartouche d'extraction	Conditionnement	Rinçage	Élution	Étapes suivantes
Israël	48	Colonne ultrafiltration (*Nanosep PALL* 10000 D cutoff)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Italie	49	Aucune	-	-	-	-
Japon	50	Cartouche *OASIS HLB*	n.c.	MeOH 20%	Acétonitrile 60%	n.c.
Luxembourg	52	Cartouche *Chromabond C18ec*	MeOH puis eau acidifiée au TFA (0,05%)	Eau acidifiée (0,05%) puis MeOH 20% acidifié au TFA (0,05%)	MeOH 90% acidifié au TFA (0,05%)	Évaporation de l'échantillonà 50°C puis récupération dans 500 µL d'eau. Filtration sur 0,45 µm
Macédoine	53	Aucune	-	-	-	-
Namibie	54	Aucune	-	-	-	-
Norvège	55	Aucune	-	-	-	-
Nouvelle-Zélande	56	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Nouvelle-Zélande	59	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Pays-Bas	61	Aucune	-	-	-	-
Pays-Bas	62	Aucune	-	-	-	-
Pologne	63	Aucune	-	-	-	-
Pologne	64	Aucune	-	-	-	-
Pologne	65	Aucune	-	-	-	-
Portugal	66	Cartouche SPE (*Tecnocroma*)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
République Tchèque	67	Cartouche SPE C18 (*Waters*)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Royaume-Uni	68	Cartouche SPE *Isolute C18* (3 mL)	MeOH (10 mL) puis eau (10 mL)	n.c.	n.c.	n.c.
Slovaquie	69	Cartouche SPE *SupelcleanTM LC-18 SPE Tubes* (3 mL, *Supelco*) et *Supelclean^{TM} ENVITM - Carb SPE Tubes* (3 mL, *Supelco*)	MeOH (5 mL) puis eau acidifiée à pH 6 (5 mL)	n.c.	MeOH à 50% acidifié au TFA (0,1%)	Évaporation puis reprise dans 400 µL de MeOH (50%)

Pays	**Code Laboratoire**	**Cartouche d'extraction**	**Conditionnement**	**Rinçage**	**Élution**	**Étapes suivantes**
Slovénie	70	Cartouche SPE selon Metcalf et Codd (2005)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Sri Lanka	71	Ajout de 5 mL de MeOH puis purification sur colonne *SPE LiChrolut® RP-18*	MeOH puis Eau	MeOH 10,20 et 30%	MeOH acidifié au TFA (0,1%)	n.c.
Suisse	73	Cartouche SPE	MeOH à 10%, 50% puis 100%	n.c.	MeOH entre 60 et 80%	Évaporation à sec sous N_2 et reprise dans MeOH. Évaporation à sec et reprise dans MeOH à 70%
Suisse	74	Aucune	-	-	-	-
Taïwan	75	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Taïwan	76	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Turquie	77	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	79	Aucune	-	-	-	-
USA	80	Aucune	-	-	-	-
USA	81	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	82	Cartouche *Strata X*	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	83	Aucune	-	-	-	-
USA	84	Aucune	-	-	-	-
USA	85	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	86	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	87	Cartouche immuno-affinité	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	88	Aucune	-	-	-	-
USA	89	Aucune	-	-	-	-
USA	90	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	91	Aucune	-	-	-	-
USA	92	Aucune	-	-	-	-
USA	93	Catouche C18 (*C18 Bond Elut*) ou *ODS (ou HLB)*	n.c.	Eau	MeOH	n.c.
USA	94	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

Pays	Code Laboratoire	Cartouche d'extraction	Conditionnement	Rinçage	Élution	Étapes suivantes
USA	95	Cartouche SPE HLB (*Waters*)	MeOH puis Eau	MeOH à 5%	MeOH à 100%	Évaporation sous N_2 à 40°C puis récupération dans 1 mL
USA	96	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

**n.c. : non communiqué.*

5.2.3.5 Saxitoxines

À ce jour, il n'existe aucun protocole d'opération standard International (norme ISO) ou Européen pour la préparation et le dosage des saxitoxines.

Selon Lawrence et al. (2005), plusieurs étapes de purification sur cartouche et d'oxydation sont recommandées en fonction des variantes de saxitoxines présentes. La Figure 5.4 représente un schéma général des étapes de purification des échantillons en fonction des toxines présentes dans l'échantillon.

5.2.3.5.1 Purification sur cartouche SPE C18

- Conditionner les cartouches C18 (Supelclean LC-18, 500 mg, 3 mL, Supelco) avec 6 mL de MeOH puis avec 6 mL d'eau;
- Passer 1 mL d'échantillon sur la cartouche à un débit compris entre 2 et 3 $mL.min^{-1}$ puis collecter le liquide dans un tube à centrifugation conique gradué;
- Rincer la cartouche à l'aide de 2 mL d'eau et récupérer le liquide dans le même tube;
- Ajuster le pH de l'extrait à 6,5 par ajout d'une solution de NaOH (1 M) puis compléter à 4 mL à l'aide d'eau;
- Diviser l'extrait obtenu en plusieurs portions pour les différentes étapes décrites dans la Figure 5.4.

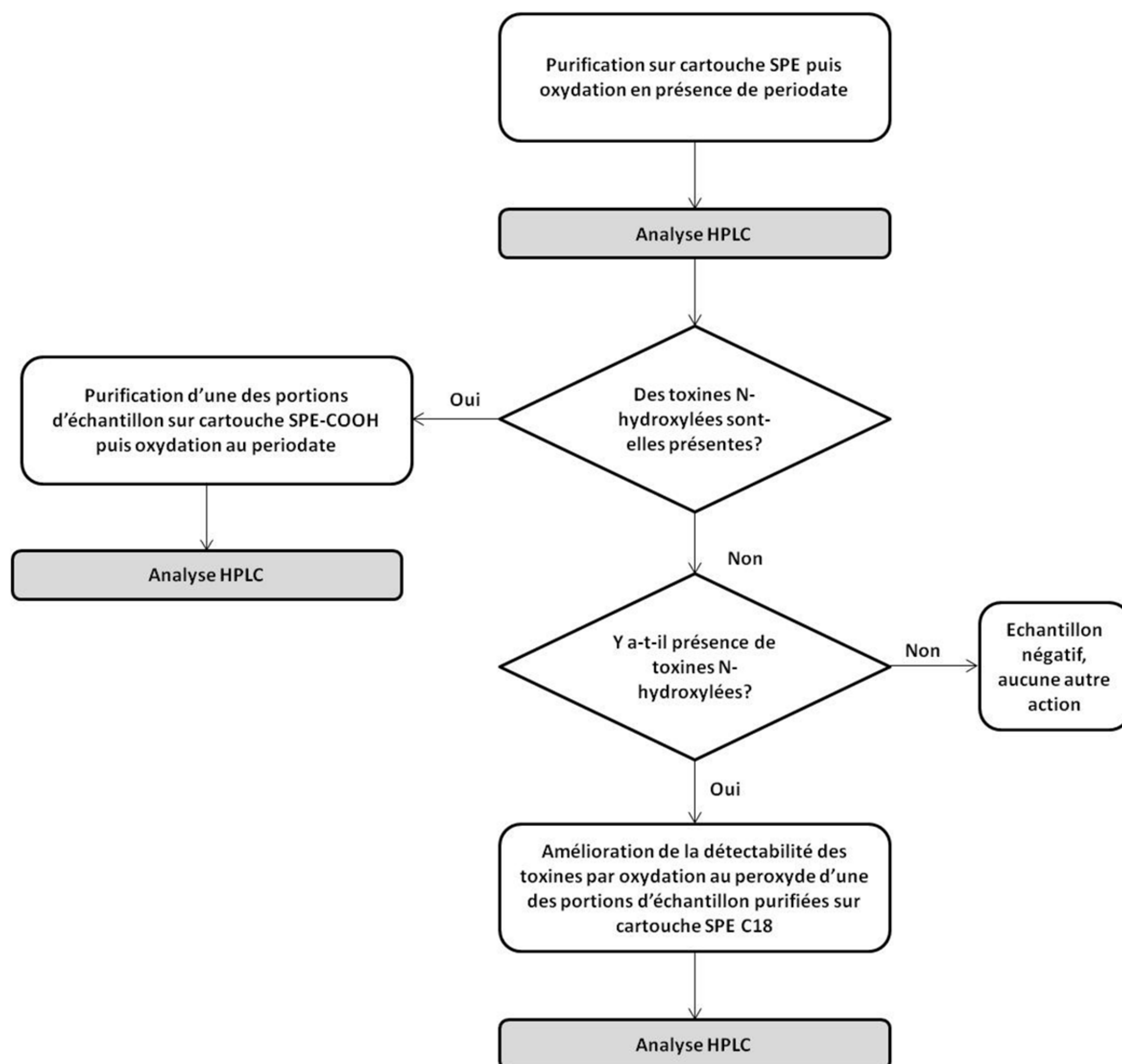


Figure 5.4 Schéma récapitulatif des étapes de purification et d'oxydation recommandées pour la quantification des saxitoxines en fonction des toxines présentes (d'après Lawrence et al. 2005)

5.2.3.5.2 Purification sur cartouche SPE-COOH (étape réalisée sur les échantillons purifiés sur cartouche SPE contenant des toxines N-hydroxylés)

- Conditionner les cartouches SPE-COOH (Bakerbond Carboxylic Acidisilane (COOH), 500 mg, 3 mL, J.T. Baker ou Phenomenex, 500 mg, 3 mL, Torrance ou Isolute SPE-COOH, 500 mg, 3 mL) avec 10 mL d'une solution d'acétate d'ammonium (0,01 M);
- Passer 2 mL d'une des portions d'échantillon purifiées au préalable sur les cartouche C18 à un débit compris entre 2 et 3 $mL.min^{-1}$ puis collecter le liquide dans un tube à centrifugation conique gradué d'une capacité de 15 mL identifié « *Fraction n°1* »;
- Rincer la cartouche à l'aide de 4 mL d'eau et récupérer le liquide dans le tube à centrifuger identifié « *Fraction n°1* » puis ajuster le volume final à 6 mL (*Remarque : ce tube* contient les C-toxines);
- Rincer la cartouche à l'aide de 4 mL d'une solution de NaCl (0,05 M) et récupérer le liquide dans un tube à centrifuger d'une capacité de 5 mL identifié « *Fraction n°2* » et s'assurer que le volume final est de 4 mL (*Remarque : ce tube contient GTX1,4; GTX2; B-1; B-2 et dcGTX2,3*);
- Rincer la cartouche à l'aide de 5 mL d'une solution de NaCl (0,3 M) et récupérer le liquide dans un tube à centrifuger d'une capacité de 5 mL identifié « *Fraction n°3* » et s'assurer que le volume final est de 5 mL (*Remarque : ce tube contient STX, NEO et dcSTX*).

Remarque : Pour les échantillons faiblement concentrés, les fractions n° 1 à 3 peuvent être collectées séparément dans des ballons à fond rond d'une capacité de 50 mL au lieu des tubes coniques à centrifugation, puis concentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45°C jusqu'à un volume final de 1 mL. Transférer ensuite la solution dans un tube conique à centrifugation à l'aide d'une pipette pasteur, puis rincer trois fois le ballon à l'aide de 0,2 – 0,3 mL d'eau et les transférer dans le tube à centrifugation. Compléter le volume final à 1 mL avant de compléter les étapes d'oxydation ou d'analyse HPLC comme décrit à la Figure 5.4.

5.2.3.5.3 Oxydation au périodate

- Prélever 100 µL de l'échantillon précédemment purifié sur cartouches à l'aide d'une micropipette et les introduire dans un tube à centrifugation en plastique d'une capacité de 1,5 mL;
- Ajouter 100 µL de la solution de modification de matrice. Cette solution est obtenue par extraction selon la méthode d'extraction décrite précédemment pour les saxitoxines sur des huîtres non contaminées en saxitoxines puis ajustement du pH à 6,5 par ajout d'une solution de NaOH à 1 M. Le mélange est laissé à réagir pendant 2 ou 3 jours pour permettre la précipitation des co-extraits. Laisser le surnageant décanter ou filtrer sur filtres 0,45 µm de type Acrodisk. Même si la solution obtenue est stable pendant 2 mois à -20°C, elle doit être préparée toutes les deux semaines. La solution modificatrice de matrice doit être analysée avant de réaliser les étapes d'oxydation pour s'assurer qu'il n'y a pas de contamination par des toxines;
- Ajouter 500 µL de la solution oxydante au périodate et bien agiter à l'aide d'un vortex. *Cette solution est préparée quotidiennement en diluant 5 mL d'une solution d'acide périodique à 0,003 M avec 5 mL d'une solution de formate d'ammonium à 0,3 M et 5 mL d'une solution de* Na_2HPO_4 *à 0,3 M puis par ajustement du pH à 8,2 par ajout d'une solution de NaOH à 0,2 M*;
- Laisser le mélange à réagir pendant 1 min à température ambiante;
- Ajouter 5 µL d'acide acétique concentré, puis mélanger avant de laisser réagir à température ambiante pendant au moins 10 min. *La solution est alors prête pour injection, elle peut conservée pendant une journée lors de l'analyse des toxines non-hydroxylatées. Les produits d'oxydation provenant des toxines NEO, B-2 et GTX1,4 se dégradent lentement (à raison de 30% aux 8 h)*.

5.2.3.5.4 Oxydation au peroxyde

- Prélever 250 µL d'une solution de NaOH à 1 M dans un tube à centrifugation en plastique d'une capacité de 1,5 mL;
- Ajouter 25 µL d'une solution de peroxyde H_2O_2 à 10% (m/v) dans le tube puis agiter;
- Ajouter ensuite 100 µL de l'échantillon précédemment purifié sur les cartouches de purification puis agiter;
- Laisser réagir le mélange pendant 2 min à température ambiante;
- Ajouter 20 µL d'acide acétique concentré puis agiter;

- Injecter ensuite 25 – 50 µL de la solution obtenue. *Cette solution est stable pendant au moins 8 h*.
- Parmi les 28 laboratoires contactés, ayant répondus à l'enquête et analysant les saxitoxines, 8 réalisent une étape de concentration et de purification de l'échantillon sur cartouche SPE de type C18 (Hypersil Gold, ThermoFisher – C18, Waters) (Tableau 5.14).

Tableau 5.14 Récapitulatif des méthodes de purification et de concentration utilisées dans les laboratoires contactés afin de favoriser l'analyse des saxitoxines (d'après les réponses aux questionnaires)

Pays	Code Laboratoire	Cartouche d'extraction	Conditionnement	Rinçage	Élution	Étapes suivantes
Australie	7	Aucune	-	-	-	-
Australie	8	n.c.*	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Brésil	11	Aucune	-	-	-	-
Bulgarie	12	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Canada	18	Aucune	-	-	-	-
Espagne	20	Cartouche SPE Hypersil Gold C18 (20 x 2,1 mm, 12 µm, Thermo Fischer Scientific) en direct lors de l'analyse par HPLC	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Espagne	21	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Finlande	24	Aucune	-	-	-	-
France	27	Aucune	-	-	-	-
France	28	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
France	29	Cartouche SPE (Waters)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
France	35	Aucune	-	-	-	-
France	37	Aucune	-	-	-	-
Japon	50	Colonne Bio-Gel P2 ou Bio-Rex 70	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Norvège	55	Aucune	-	-	-	-
Nouvelle-Zélande	56	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Nouvelle-Zélande	59	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Pays-Bas	61	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Pologne	65	Aucune	-	-	-	-
USA	81	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	82	Cartouche C18	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

Pays	Code Laboratoire	Cartouche d'extraction	Conditionnement	Rinçage	Élution	Étapes suivantes
USA	83	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	84	Aucune	-	-	-	-
USA	85	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	86	Cartouche SPE	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	89	Aucune	-	-	-	-
USA	90	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	93	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

**n.c. : non communiqué.*

5.3 Détection, identification et quantification des cyanotoxines

Les diverses méthodes d'analyse utilisées dans les laboratoires à travers le monde peuvent être classées en deux catégories (Tableau 5.15) en fonction de leurs limites de détection et de quantification :

- **Méthodes de détection** : dosage biologique sur souris, méthode ELISA, dosage biologique à la phosphatase (PPIA);
- **Méthodes d'identification et de quantification** : méthodes chromatographiques (GC/FID, GC/MS, HPLC/UV, LC/MS, LC/MS/MS). Les méthodes chromatographique en phase gazeuse de détection et de quantification de l'anatoxine-a ne seront pas développées dans le présent rapport car elles ne semblent pas utilisées par les laboratoires d'analyse à travers le monde (du moins ceux contactés).

Généralement, les méthodes de détection sont utilisées sans purification de l'échantillon et permettent d'indiquer la présence ou non de toxines dans l'échantillon. Parmi les méthodes de détection existantes, la méthode ELISA est la plus utilisée, elle peut être qualitative, semi-quantitative ou quantitative. Les méthodes d'identification et de quantification, plus sophistiquées et coûteuses, sont généralement utilisées lors de la détection de toxines pour confirmer leur identité, notamment dans le cas des microcystines. Les laboratoires d'analyse combinent souvent les méthodes de détection et les méthodes d'identification et de quantification afin d'assurer une meilleure surveillance des eaux récréatives ou de consommation car un échantillon peut contenir plusieurs toxines différentes.

Tableau 5.15 Présentation des méthodes de détection, d'identification et de quantification utilisables en fonction des cyanotoxines ciblées

Méthodes analytiques	ATX	CYL	MCs	NODs	STX	BMAA
Méthodes de détection						
Essais sur souris	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
PPIA	Non	Non	Oui	Non	Non	Non
ELISA	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Méthodes d'identification et de quantification						
GC/FID	Oui	Non	Non	Non	Non	Non
GC/MS	Oui	Non	Non	Non	Non	Non
HPLC/UV	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
HPLC/Fluorométrie	-	-	-	-	Oui	Oui
LC/MS	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
LC/MS/MS	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui

5.3.1 Bio-essais *in vivo*

Les bio-essais reposent sur l'injection intra-péritonéale ou le contact direct d'un animal (souris ou invertébrés) avec un extrait (0,1 à 1,0 mL) obtenu à partir d'un échantillon d'eau concentré, d'une matrice complexe ou de biomasse de cyanobactéries ayant subit au préalable un traitement par sonication ou des cycles de congélation-décongélation pour faciliter la lyse cellulaire. Dans le cas où des volumes supérieurs à 0,5 mL sont injectés aux animaux, il est fortement recommandé de préparer l'extrait dans une solution saline physiologique. Les bio-essais les plus couramment utilisés sont effectués sur des souris et plus particulièrement sur des souris albinos suisses mâles de préférence. Les animaux sont ensuite surveillés pendant 24 h (7 jours si la présence de cylindrospermopsine est soupçonnée) afin d'observer l'apparition de symptômes. Après la période d'observation, les animaux sont tués selon une méthode approuvée et une observation des tissus est réalisée (foie, reins). En se basant sur les symptômes développés et l'observation post-mortem des tissus (dégénération et vacuolation du parenchyme hépatique dans le cas de microcystines par exemple), il est possible de déterminer si des cyanotoxines sont présentes et de quel type il s'agit (hépatotoxines, neurotoxines, dermatotoxines). Il est à noter que si plusieurs toxines sont présentes dans l'échantillon, la toxine ayant la plus grande vitesse d'action pourrait masquer l'effet des autres toxines (Chorus et Bartam 1999).

Les essais biologiques sur les souris ont été amplement utilisés au cours de ces dernières décénnies afin de déterminer, en quelques heures seulement, la toxicité totale d'une efflorescence cyanobactérienne; mais ils sont peu employés de nos jours par les laboratoires d'analyse pour des raisons d'éthique. Cependant, cette méthode de détection s'avère peu sensible et peu spécifique. Les résultats de toxicité sont exprimés sous la forme de DL_{50}, en mg de cellule sèche par kg de souris (Chorus et Bartam 1999). La toxicité est ensuite évaluée en se basant sur les critères suivants :

- > 1 000 : non toxique;
- 500 < x < 1 000 : toxicité faible;
- 100 < x < 500 : toxicité moyenne;
- < 100 : toxicité élevée.

Les principaux inconvénients liés aux bio-essais sur les souris sont décrits ci-dessous :

- De très faibles concentrations en toxines ne peuvent être détectées, nécessitant une concentration des échantillons;
- La présence de plusieurs toxines peut causer des effets synergiques ou antagonistes;
- Des faux-positifs ou faux-négatifs peuvent apparaître;
- Les résultats sont très variables pour un même échantillon étant donné que les organismes vivants utilisés peuvent être plus ou moins en bonne santé initialement;
- Il est nécessaire d'être équipé pour accueillir les animaux.

De nos jours, pour des raisons d'éthique et de manque de spécificité, les bio-essais sur souris sont peu utilisés pour la détection de l'anatoxine-a, des microcystines et de la cylindrospermopsine. Cependant, une des méthodes officielles de détection des saxitoxines (méthode AOAC 959.08) se base sur ces bio-essais et est utilisée par certains laboratoires (EURLMB 2010), par exemple en Australie et en Nouvelle-Zélande. Cette méthode de détection permet de fournir des résultats rapides et relativement précis de la toxicité relative d'un échantillon. La méthode standard définie par Hollingworth et Wekell (1990) est reconnue par le « *Food Standards Australia New Zealand* » comme étant une méthode officielle pour la détection des saxitoxines.

La méthode AOAC 959.08 (2010) préconise l'injection de 1 mL de l'extrait (se référer à la section 4.2.2.) dilué à 2 ou 3 souris de préférence, puis l'observation du temps de rétention entre l'injection et le décès des souris. Si le temps de rétention est inférieur à 5 min, il est recommandé de diluer davantage l'extrait

de manière à ce que le temps de rétention se situe entre 5 et 7 min (AOAC 959.08 2010). Afin de pouvoir exprimer les résultats, il est important de noter la masse de chacune des souris injectée pour ajuster le facteur de conversion permettant d'établir la valeur de la toxicité si le poids des souris est inférieur à 19 g ou supérieur à 21 g. Certains éléments (souche ou sexe des souris, forte teneur en NaCl, présence de métaux dont le zinc, pH de l'extrait injecté) peuvent interférer, entraînant une surestimation ou une sous-estimation de la toxicité relative de l'échantillon considéré (EURLMB 2010).

De manière générale, la limite de détection des bio-essais sur souris est estimée à 40 µg STX éq.100 g^{-1} de fruit de mer (20 ng.mL^{-1}). Dans la plupart des pays, le niveau d'alerte pour la gestion des activités de pêche est fixé à 80 µg STX éq.100 g^{-1} de fruit de mer. La méthode AOAC 959.08 basée sur la détection des saxitoxines par bio-essais sur souris permet de gérer adéquatement les eaux de consommation et les eaux récréatives puisque sa limite de détection est en-dessous des niveaux d'alerte définis par différents pays. Cette méthode est utilisée en Nouvelle-Zélande pour la détection des toxines PSP dont les saxitoxines dans les eaux côtières (Anderson et al. 2001).

Une étude comparative a été menée par Ledoux et Hall (2000) parmi huit laboratoires français afin d'évaluer les perfomances de la méthode AOAC 959.08 pour détecter la toxicité liée à la présence de saxitoxines dans l'eau. Afin de réduire les variations inter-laboratoires, les organisateurs de l'étude comparative ont demandé aux laboratoires de suivre le protocole de la méthode AOAC 959.08 et de fixer le pH de l'extrait à 3 afin de s'assurer que la conversion de certaines saxitoxines en composés plus toxiques soit similaire pour l'ensemble des laboratoires participants. Les résultats de cette étude sont présentés au Tableau 5.16. Cette modification du protocole de la méthode AOAC 959.08 a permis de mettre en évidence une bonne répétabilité, avec des variations intra-laboratoires comprises entre 5,4 et 9,8%, et une bonne reproductibilité, avec des variations inter-laboratoires comprises entre 7,8 et 39,6%, pour la détection des saxitoxines (solution standard, eau acidifiée, fruit de mer non contaminé, fruit de mer naturellement contaminé et deux échantillons de fruit de mer dopés). Selon les auteurs, les variations inter-laboratoires sont majoritairement dues aux facteurs de dilution que les différents analystes utilisent, mettant ainsi en évidence la nécessité de bien définir tous les paramètres pouvant influencer les résultats (pH de la solution, facteur de dilution, etc.) lors de comparaisons inter-laboratoires. Dans cette étude comparative, une très bonne récupération des saxitoxines pour l'échantillon d'eau dopé (97,5%) a été observée, mais une faible récupération dans le cas des échantillons de fruits de mer dopés (35,1% pour les ajouts faibles et 46,6% pour les ajouts modérés). Les différences observées pour les échantillons de fruits de mer pourraient être dues au fait que les bio-

essais sur souris peuvent sous-estimer la teneur en toxines d'un échantillon de près de 60% en raison du « *salt effect* » (Ledoux et Hall 2000).

Tableau 5.16 Concentrations en saxitoxines (exprimée en µg $STX.MU^{-1}$ pour l'échantillon 1, en µg $STX.mL^{-1}$ pour l'échantillon 2 et en µg STXéq.100 g^{-1} de fruit de mer pour les autres échantillons) mesurées dans différents échantillons d'après une étude comparative réalisée sur la méthode d'analyse AOAC 959.08 (Ledoux et Hall 2000)

No. Échantillons	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ajout dosé	-	1,135	-	-	-	152,8	152,8	334,7	334,7
Analyse LC	-	-	ND	-	-	153,4	153,4	305,7	305,7
Laboratoires									
1	0,20	0,91	< 35,0	58,0	58,0	55,6	63,4	155,2	270,9
2	0,18	1,21	< 31,5	62,1	57,4	61,1	51,5	273,9	230,1
3	0,19	1,15	< 33,3	-	52,6	49,5	51	157,6	157,3
4	0,19	1,04	< 33,3	56,3	56,4	50,1	49,3	118,6	121,7
5	0,22	1,12	< 38,5	49,3	50,2	46,4	47,3	85,8	99,0
6	0,20	1,21	< 35,9	65,1	56,8	54,5	60,4	112,7	116,7
7	0,16	1,03	< 28,0	56,6	50,4	50,4	43,5	99,7	111,8
8	0,20	1,17	< 35,0	57,7	58,6	69,5	55,3	221,4	256,5
9	0,20	1,12	-	-	-	-	-	-	-
Moyenne	0,19	1,107	-	56,4		53,7		155,6	
Ecart-type	0,02	0,098	-	1,3		6,9		59,6	
Coefficient de variation (%)		8,8	-	2,3		12,8		38,3	
Récupération (%)	-	97,5	-	-		35,1		46,5	

Alors que les bio-essais sur souris de moins en moins utilisés, des essais biologiques sur des invertébrés ont été développé et sont désormais commercialisés (Afssa et Afsset 2006; Msagati et al. 2006; Törökné et al. 2004) :

- Trousse ThamnoToxkit de la marque MicroBioTests Inc.;
- Trousse RapidToxkit de la marque MicroBioTests Inc.;
- Trousse RoToxkit de la marque MicroBioTests Inc.

Le test 24h-ThamnoToxkit (Figure 5.5-a) est basé sur le taux de mortalité (LC_{50}) des larves du crustacé *Thamnocephalus platyurus* présentes dans le kit sous forme « *d'œufs dormants* » (pouvant éclore sur

demande) en présence de composés toxiques tels que les cyanotoxines. Ces trousses permettent d'évaluer la dose létale médiane LC_{50} de l'échantillon considéré. La trousse ThamnoToxkit commercialisée par MicroBioTests Inc. répond aux critères du protocole standard ISO 14380 et permet de déterminer la toxicité aigüe d'un échantillon d'eau. Le test 1 h-Rapidoxkit (Figure 5.5-b) est pour sa part basé sur la diminution ou l'absence d'ingestion de microsphères rouges par les organismes d'essai (*T. platyurus*) stressés par la présence de contaminants. Ce test permet d'évaluer la concentration effective EC 50 et peut détecter des contaminants à des concentrations se situant en-dessous de la dose létale pour les humains, faisant de lui un moyen de détection rapide et efficace de la contamination de l'eau. Le test Acute-RoToxkit F (Figure 5.5-c) est basé sur le taux de mortalité (LC_{50}) après 24 h des larves du rotifère *Brachionus calyciflorus* présentes dans le kit sous forme « *d'œufs dormants* » (pouvant éclore sur demande) en présence de composés toxiques tels que les cyanotoxines. Cette trousse permet d'évaluer la dose létale médiane (24 h LC_{50}). Le test Short-Chronic RoToxkit F, quant-à-lui, est basé sur l'inhibition de la croissance de la population des rotifères sous l'effet d'un contaminant toxique après 48 h d'exposition. Cette trousse permet d'évaluer la concentration effective médiane (48hEC 50). Après 24 ou 48 h de mise en contact des rotifères avec l'échantillon d'eau, ces derniers sont comptabilisés au microscope après immobilisation dans du Lugol (Short-Chronic RoToxkit F) ou évalués pour leur survie (Acute RoToxkit F). Les trousses Short-Chronic RoToxkit F commercialisées par MicroBioTests Inc. répondent aux critères du protocole standard ISO 20666 permettant de déterminer la toxicité chronique de *Brachionus cayciflorus* sous 48 h d'un échantillon d'eau fraîche ou d'eau usée (ISO 20666 :2008 : Water Quality – Determination of the toxicity to Brachionus Calyciflorus in 48 h).

Selon l'étude comparative menée par Törökné et al. (2006), les trousses commerciales 24 h-ThamnoToxkit et 1 h-RapidToxkit représentent une bonne alternative aux bio-essais sur souris pour une détection rapide et efficace des microcystines présentes dans un échantillon d'eau brute. Les résultats obtenus à travers ces deux trousses commerciales indiquent une bonne corrélation (r^2 = 0,82) entre les effets sublétaux et létaux liés aux cyanotoxines présentes dans les échantillons d'eau. Selon les auteurs, le 1h-RapidToxkit représente une alternative intéressante à la trousse 24 h-ThamnoToxkit puisqu'elle permet d'obtenir des résultats similaires sur plus de 19 échantillons d'eau en un temps plus court permettant de répondre plus rapidement dans un cas de gestion des eaux récréatives ou de consommation. Cependant, en cas de contamination par la cylindrospermopsine, le test 1 h-RapidoToxkit s'avère inefficace en raison du temps très élevé d'inhibition par la cylindrospermopsine de la consommation des microsphères par les larves de *T. platyurus*. De plus, les toxicités relatives mesurées à l'aide des trousses commerciales sont supérieures à celles estimées à l'aide d'une

quantification des microcystines par HPLC-UV, ce qui suggère la présence potentielle d'autres toxines dans les échantillons qui n'auraient pas été détectées par HPLC-UV. Selon l'étude menée par Juneau et al. (2012), le test RoToxkit a montré une faible sensibilité concernant la toxicité des microcystines (entre 0,8 et 11 µg.mL^{-1}) et aucune toxicité pour l'anatoxine-a pour ce rotifère à des concentrations inférieures à 50 µg.mL^{-1}. Des problèmes liés aux solvants utilisés lors des essais ainsi que leurs coûts élevés ont entraîné l'abandon de ces trousses commerciales pour le développement d'un bio-test permettant d'évaluer rapidement et efficacement la toxicité d'un échantillon d'eau.

À ce jour, aucun des laboratoires d'analyse ayant répondu à notre enquête n'utilise les trousses commerciales.



Figure 5.5 Photographies des trousses commerciales ThamnoToxkit (a.), Rapidoxkit (b.) et Rotoxkit (c.) provenant du fournisseur MicroBioTests Inc. pouvant être utilisées pour la détection des cyanotoxines

5.3.2 Tests biochimiques (test PPIA)

Les tests biochimiques ou enzymatiques sont basés sur le pouvoir inhibiteur des cyanotoxines sur l'activité de certaines enzymes ou protéines. Par exemple, les microcystines et les nodularines inhibent les protéines phosphatases de sérine/théorine, responsables de la déphosphorylation des phosphoprotéines intracellulaires de type 1 et 2A (PP1 et PP2A) in vitro et in vivo à de faibles concentrations. De manière générale, la protéine phosphatase PP2A est capable d'hydrolyser le p-nitrophénylphosphate en p-nitrophénol, un composé pouvant être détecté à 405 nm par un spectrophotomètre UV. En présence de cyanotoxines, l'inhibition des protéines phosphatases entraîne une diminution de la concentration en p-nitrophénol produit qui est directement proportionnelle à la quantité de cyanotoxines présentes dans l'échantillon. Les résultats de ces tests enzymatiques sont souvent exprimés en $\mu g.L^{-1}$ MC-LR (équivalent MC-LR). De manière générale, la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) de ces tests est estimée à 1,2 ppb et la limite de détection à 0,1 ppb. Un des inconvénients pouvant être rencontrés lors de l'utilisation de ces tests enzymatiques est l'inhibition de la protéine phosphatase liée à la présence de phosphatases endogènes dans l'échantillon, entraînant une sous-estimation de la teneur en microcystines totales (Morral et al. 2001). Selon Triantis et al. (2010), la méthode PPIA demeure un outil utile pour la détection de l'activité toxique associée à la présence de microcystines. Un des avantages lié à l'utilisation de cette méthode est qu'aucune préparation préalable des échantillons n'est requise. De plus, cette méthode peut être utilisée avec des microplaques (kits commerciaux ou préparation dans le laboratoire d'analyse) et permet de déterminer simultanément les activitiés toxiques liées aux MCs et NODs pour un grand nombre d'échantillons en un temps très court (< 1 h).

Les kits commercialisés de nos jours, tels que les kits Microcystins/Nodularins PP2A Microtiter Plate (Produit N° 520032) et Microcystins/Nodularins PP2A Tubes (Produit N° 520033) et Zeu-Immunotec MicroCystest (Figure 5.6), permettent une détection et une quantification rapide des microcystines et des nodularines à des concentrations inférieures aux concentrations limites définies par l'OMS (1 $\mu g.L^{-1}$). Les kits Microtiter Plate et Tubes permettent respectivement une analyse quantitative semi-quantitative des microcystines et nodularines. Les domaines de linéarité de ces kits sont compris entre 0,25 et 2,50 µg.L-1 pour le kit Microtiter Plate et entre 0,5 et 2,50 µg.L-1 pour le kit Tubes. Le test MicroCystest quant-à-lui permet de détecter et quantifier les microcystines intra- et extra-cellulaires présentes dans les eaux récréatives et de consommation.



Figure 5.6 Photographie du kit commercial Zeu-Immunotec MicroCystest Plate provenant du fournisseur Zeu-Immunotec

Les étapes de préparation des échantillons recommandées par le fournisseur sont les suivantes (Zeu-Immunotec 2006):

Eaux récréatives (Eaux de rivière, de réservoirs, etc…) – Toxines intra-cellulaires

- Prélever 200 mL d'échantillon puis les filtrer sous vide à travers une membrane dont la porosité est de 0,8 µm. *Conserver le filtrat pour pouvoir déterminer par la suite la teneur totale en microcystines*.
- Récupérer le filtre et le positionner dans un tube en verre. *La membrane peut être coupée en morceaux pour améliorer l'efficacité de l'étape d'extraction*.
- Ajouter 10 mL d'une solution de MeOH (80%), d'acide trifluoroacétique (0,1%) et de Tween 20^{TM} (0,1%). Incuber à température ambiante pendant 30 min en agitant doucement. Il est important de réaliser cette étape à l'abri de la lumière;
- Centrifuger à 4 000 g pendant 5 min;
- Prélever le surnageant et le diluer 20 fois (1/20) avec de l'eau déminéralisée. *Si la concentration mesurée est supérieure à 2,5 µg.L^{-1}, il est recommandé de diluer le surnageant par 1/20, 1/200, 1/2 000 au besoin*.

Dans le cas de toxines extracellulaires, aucune préparation des échantillons n'est requise, la teneur en toxines extracellulaires peut être déterminée à l'aide du kit directement. Si des risques d'interférences sont suspectés, il est recommandé de contacter le fournisseur.

Eaux de consommation

- Prendre 1 mL de l'échantillon d'eau homogénéisé, l'introduire dans un vial puis ajouter 0,2 ± 0,1 g de résine à l'aide d'une spatule. La précision de la quantité de résine ajoutée n'a pas d'influence critique sur l'essai.
- Agiter le mélange pendant 5 min à température ambiante (manuellement ou à l'aide d'un vortex);
- Chauffer le mélange à 100°C à l'aide d'un bain-marie pendant 5 min puis laisser refroidir. La résine doit rester au fond du vial.

Une fois la préparation des échantillons terminée, les étapes préconisées par le fournisseur pour l'utilisation du kit sont les suivantes :

- Ajouter 50 µL de chaque solution standard de MC-LR en duplicats dans les puits de la plaque (par exemple, puits A1 et A2 : standard 0,25 $µg.L^{-1}$; puits B1 et B2 : standard 0,50 $µg.L^{-1}$; puits C1 et C2 : standard 1,00 $µg.L^{-1}$ et puits D1 et D2 : standard 2,50 $µg.L^{-1}$);
- Ajouter 50 µL de chaque échantillon dans un puits de la plaque. Chaque échantillon doit être analysé en duplicats. Pour les échantillons d'eau potable, faire attention de ne pas prélever de résine.
- Ajouter 70 µL de solution phosphatase dans chaque puits;
- Ajouter 90 µL de substratc dans chaque puits et agiter doucement. Le substrat chromogénique contient des particules solides en suspension, ne pas agiter la solution avant utilisation et faire attention de ne pas prélever de particules solides.
- Mettre un film adhésif sur les puits de la plaque puis incuber pendant 30 min à 37°C;
- Ajouter 100 µL de la solution Stop dans chaque puits;
- Lire l'absorbance de chaque standard et chaque échantillon à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Dans le cadre du Programme EFFLOCYA réalisé en France en 2002, le suivi et la détection des microcystines dans des échantillons d'eau douce ont été réalisés à l'aide de tests enzymatiques basés sur la déphosphorylation de la protéine phosphatase 2A (test PP2A). Lorsque des réponses positives ont

été obtenues à partir des tests PP2A, une confirmation ainsi qu'une quantification des microcystines ont été menées par HPLC-UV (Sarazin et al. 2002). L'étude comparative de Rapala et al. (2002) a montré que les tests enzymatiques PP1 donnent des résultats comparables aux méthodes immunologiques de type ELISA et aux méthodes chromatographiques (HPLC-UV). Les auteurs ont mis en évidence que pour deux des microcystines étudiées (MC-RR et [D-Asp3]MC-RR), le test immunologique PP1 donne des résultats différents de près de 5% par rapport aux autres méthodes de référence (ELISA et HPLC-UV). Selon les auteurs, les techniques PP1 et ELISA sont d'excellentes techniques de détection des toxines permettant une gestion efficace des eaux récréatives et de consommation en répondant rapidement lors de l'apparition de fleurs d'eau productrices de toxines à des concentrations supérieures aux seuils définis. Cependant, les auteurs recommandent une confirmation des résultats positifs à l'aide d'une méthode chromatographique permettant ainsi d'identifier les toxines présentes et de confirmer les concentrations mesurées. Selon l'étude réalisée par James et al. (2011), le kit Zeu-Immunotec Microcystin Test permet une quantification rapide (30 min), précise (récupération entre 79 et 100% lors de l'analyse d'ajouts dosés) et reproductible (coefficient de variation entre 0 et 30%) des microcystines présentes dans les échantillons d'eau. La gamme de linéarité de ces kits s'étend entre 0,10 et 2,00 $\mu g.L^{-1}$ pour MC-LR, entre 0,50 et 2,00 $\mu g.L^{-1}$ pour MC-LA, et entre 0,50 et 4,00 $\mu g.L^{-1}$ pour MC-RR. Les limites de détection de ces kits commerciaux sont respectivement estimées à 0,24, 0,17 et 0,61 $\mu g.L^{-1}$ pour MC-LR, MC-LA et MC-RR. Suite à l'étude réalisée par James et al. (2011), ce kit commercial a été approuvé par l'USEPA. Les résultats de cette étude sont présentés dans la section 5.3.3 au Tableau 5.19.

Les tests enzymatiques inhibiteurs de la protéine phosphatase (PPIA) sont peu utilisés par les laboratoires d'analyse à travers le monde pour la détection et la quantification des microcystines (11 laboratoires sur les 78 répondants) et de l'anatoxine (1 laboratoire de recherche sur les 33 répondants) (Tableau 5.17).

Tableau 5.17 Récapitulatif des conditions opératoires utilisées dans les laboratoires contactés réalisant l'analyse des microcystines et de l'anatoxine-a par la méthode PPIA (d'après les réponses aux questionnaires)

Pays	Code Laboratoire	Matériel	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût	Méthode référence
Autriche	10	n.c.*	CyanoBiotech GmbH	LD = 1,0 ppb	n.c.	50 €	Fastner et al. (1998); Kurmayer et al. (2004)
France	28	n.c.	n.c.	n.c.	2 jrs	n.c.	n.c.
France	31	n.c.	MC-LR Novakits 5 µg.mL^{-1}	LD = 0,001 ppb LQ = 0,005 ppb	4 h	300 €	n.c.
Grèce	43	kit Zeu Immunotec	MC-LR, MC-RR et MC-YR : Sigma ; MC-LA et NOD: Abraxis, Enzo Chemicals et MC-LR, MC-RR et NOD : DHI Water	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Pologne	64	kit fabriqué au centre	Enzo Life Sciences	n.c.	2 jrs	50 €	An et Carmichael (1994)
Pologne	65	n.c.	Alexis, Sigma Aldrich	n.c.	n.c.	25 €	Meriluoto et Codd (2005)
Slovénie	70	n.c.	n.c.	n.c.	2 jrs	n.c.	Metcalf et Codd (2005)
Sri Lanka	71	kit Zeu-Immunotec	Sigma Aldrich	n.c.	2-3 jrs	24$	n.c.
Turquie	77	n.c.	n.c.	n.c.	1 jr	n.c.	n.c.
USA	89	n.c.	n.c.	n.c.	2 h	n.c.	n.c.
USA	91	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

**n.c. : non communiqué.*

L'inhibition in vitro et in vivo de l'acétylcholine-estérase (AchE), un récepteur neurologique, par l'anatoxine-a(S) a permis le développement d'un test enzymatique à la fois qualitatif et quantitatif (Lavoie et al. 2007). Cependant, ce test enzymatique n'est pas sélectif de l'anatoxine-a(S) et peut réagir avec d'autres contaminants tels que les pesticides organophosphorés retrouvés dans les eaux de surface

(Chorus et al. 1999). De manière générale, ces tests enzymatiques ont l'avantage d'évaluer rapidement l'activité biologique et par conséquent la toxicité d'un échantillon donné liée à la présence de cyanotoxines (microcystines/nodularines ou anatoxine-a(S)).

5.3.3 Tests immunologiques

Les tests immunologiques de type ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) sont basés sur le principe de la reconnaissance de motifs structuraux spécifiques de certaines toxines ou familles de toxines par des anticorps. Les méthodes immunologiques de détection et de quantification des cyanotoxines utilisent en général des anticorps poly- ou mono-clonaux dirigés contre ces toxines (Deblois et al. 2006; Decy et al. 2009). Elles permettent de quantifier une certaine classe de toxines ou une toxine en particulier, de façon qualitative, semi-quantitative ou quantitative. Ces techniques sont plus adaptées pour le dosage des toxines extracellulaires, alors qu'une préparation des échantillons (extraction et/ou lyse cellulaire) est nécessaire pour le dosage des toxines intracellulaires. De manière générale, la concentration en toxines est déterminée par la mesure de la coloration que prend la solution et qui est inversement proportionnelle à la concentration en toxines dans l'échantillon. De nombreux kits commerciaux ELISA sont disponibles pour la détection et la quantification des microcystines, des nodularines, de la cylindrospermopsine et des saxitoxines, mais peu sont disponibles pour le dosage de l'anatoxine-a (USEPA 2012). Le Tableau 5.18 présente les différents kits disponibles pour l'analyse des cyanotoxines ainsi que leur spécificité. Les tests ELISA permettent de détecter et parfois de quantifier les cyanotoxines présentes dans les eaux récréatives et de consommation et ce à faible coût (10 à 20 dollars par échantillon) et en un temps limité (<24 h). Cette méthode d'analyse permet de confirmer ou d'infirmer rapidement la présence de toxines, permettant une gestion rapide et efficace des eaux, contrairement aux méthodes chromatographiques qui sont plus coûteuses (réduction du nombre d'échantillons) et plus longues (quelques jours) en raison du manque de disponibilité des appareils analytiques. Bien que les kits ELISA disponibles sur le marché donnent des résultats rapides, ces derniers manquent parfois de précision, de sensibilité et de spécificité (USEPA 2012). Dans le cas où des résultats positifs sont obtenus, une confirmation des résultats ainsi qu'une identification des microcystines doit être réalisée à l'aide d'une méthode chromatographique. Un des inconvénients liés à l'utilisation de kits ELISA pour la détection de cyanotoxines est le risque d'obtenir des faux-négatifs ou de faux-positifs ainsi que la nécessité de diluer les échantillons plusieurs fois pour les kits dont les domaines de linéarité sont peu étendus.

Tableau 5.18 Liste non exhaustive des kits ELISA commerciaux disponibles pour la détection et la quantification des différentes cyanotoxines

Molécule analysée	Fournisseur	Nom du kit	N° Produit	Type Analyse*	Gamme (µg.L^{-1})	LD (µg.L^{-1})	Répétabilité – CV** (%)	Ajouts dosés - Récupération (%)	Nb de puits/ tubes	Temps (min)	Coût ($)	Eaux récréatives	Eaux potables
ATX	*Abraxis LLC (Novakit - Europe)*	*Anatoxin-RBA Kit*	PN 520050	QN	10 -500	10	n.c***	n.c	96	> 90	600	X	X
BMAA	*Abraxis LLC (Novakit - Europe)*	*BMAA ElisaMicrotiter Plate*	PN 520040	QN	5 - 500	4	n.c	n.c	96	> 120	600	X	X
CYL	*Abraxis LLC (Novakit - Europe)*	*Cylindrospermopsin Elisa Microtiter Plate*	PN 522011	QN	0 - 2 + Contrôle à 0,75 ± 0,185	0,04	4,9 - 8,3	98 - 103	96	> 90	500	X	X
	Beacon Analytical System Inc	*Cylindrospermopsin ELISA Kit*	20-0149	QN	0,1 - 2	n.c	n.c	n.c	96	90	325	X	X
MCs/ NODs	*Abraxis LLC (Novakit - Europe)*	*Microcystin ADDA Plate Kit*	PN 520011	QN	0 – 5 + Contrôle à 0,75 ± 0,185	0,1	n.c	n.c	96	> 150	440	X	X
	Abraxis LLC (Novakit - Europe)	*Microcystin DM Plate Kit*	PN 522015	QN	0 – 5 + Contrôle à 0,75 ± 0,185	0,1	3 - 6,5	95 - 96	96	> 120	400	X	X
	Abraxis LLC (Novakit - Europe)	*Microcystins Strip Test*	PN 522016 522017	QL	0,5 - 5	n.c.	n.c	n.c	5 T 20 T	> 35	n.c	-	X

Molécule analysée	Fournisseur	Nom du kit	N° Produit	Type Analyse*	Gamme ($\mu g.L^{-1}$)	LD ($\mu g.L^{-1}$)	Répétabilité – CV** (%)	Ajouts dosés - Récupération (%)	Nb de puits/ tubes	Temps (min)	Coût ($)	Eaux récréatives	Eaux potables
MCs/ NODs	*Abraxis LLC (Novakit - Europe)*	*Microcystin Tube Field Kit*	PN 520036	QL	0 - 3	0,3	n.c	n.c	36	> 30	150	X	X
	Abraxis LLC (Novakit - Europe)	*Microcystins ELISA kit*	PN 520012	QN	0,15 - 5	n.c	0,3 - 1,9	n.c	40	> 40	400	X	X
	Beacon Analytical System Inc	*Microcystin ELISA Kit*	20-0068	QN	0,1 - 2,0	n.c	0,5 - 3,5	n.c	96	60	300	X	X
	Beacon Analytical System Inc	*Microcystin ELISA Tube Kit*	20-0098	QN	0,3 - 5,0	n.c	0,2 - 0,7	n.c	40	40	220	X	X
	Envirologix (Libios - Europe)	*Qualitube Kit for Microcystins - Field test*	ET 022	S-QN	0,5 - 3	0,3	8,1 - 9,6	n.c	36	35	n.c	X	-
	Envirologix (Libios - Europe)	*QuantiPlate Kit for Microcystins - Lab test*	EP 022	QN	0,16 - 2,5	0,147	1,6 - 5,0	n.c	96	90 - 120	n.c	X	-
	Enzo (Alexis - Europe)	*Microcystin (Adda specific) ELISA Kit*	ALX-850-319KI01	QN	0,15 - 0,5	0,1	n.c	n.c	96	150	650	X	X
	SDIX - Envirogard™	*Envirogard™ Microcystins QuantiTube Test Kit*	7700000	QN	0,2 - 4	0,1	9 - 11	n.c	n.c	n.c	n.c	X	X
NODs	*Beacon Analytical System Inc*	*Nodularin ELISA Kit*	20-0199	QN	0,04 - 1	0,04	0,8 - 2,6	n.c	96	60	325	X	X
STX	*Abraxis LLC (Novakit - Europe)*	*Saxitoxins (PSP) Elisa Microtiter Plate*	PN 52255B	QL et QN	0 - 0,4	0,015	n.c	n.c	96	> 60	500	X	X
	Bioscientific	*MaxSignal® Saxitoxin ELISA Test*	1034-01	QN	n.c	0,4	n.c	n.c	96	90	n.c	X	X

** QN : Quantitatif, S-QN: Semi-quantitatif, QL: Qualitatif - ** CV : Coefficient de variation - ***n.c. : non communiqué.*

5.3.3.1 Anatoxine-a

De nos jours, il existe peu de kit ELISA commercialisés permettant la détection et la quantification de l'anatoxine-a (USEPA 2012). Un seul kit commercialisé par la compagnie Abraxis LLC (Anatoxin-RBA Kit) a été répertorié permettant la détection et la quantification de l'anatoxine-a dans les eaux récréatives et de consommation. Ce test est basé sur l'affinité de l'anatoxine-a pour les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChRs). En présence d'anatoxine-a dans l'échantillon d'eau, cette toxine compétitionne avec la molécule α-bungarotoxine pour se fixer aux récepteurs nAChRs présents au fond des puits de la plaque. Après ajout d'une solution contenant une molécule se liant avec la molécule α-bungarotoxine puis d'un substrat, une coloration bleue inversement proportionnellement à la quantité d'anatoxine-a apparaît. L'intensité de cette coloration lue à l'aide d'un spectrophotomètre permet de déterminer la concentration en anatoxine-a. Selon le fournisseur Abraxis LLC, le domaine de linéarité de ce kit est compris entre 10 et 500 $\mu g.L^{-1}$ de toxine avec un seuil de détection estimé à 10 $\mu g.L^{-1}$ et un coefficient de variation lié à sa reproductibilité inférieur à 15%.

Parmi les 33 laboratoires analysant l'anatoxine-a contactés et ayant répondus à l'enquête, seulement 7 laboratoires détectent et quantifient l'anatoxine-a à l'aide d'une méthode immunologique de type ELISA.

5.3.3.2 BMAA

À notre connaissance, il n'existe, à ce jour, qu'un seul kit commercialisé par la compagnie Abraxis LLC permettant la détection et la quantification de la toxine BMAA dans les eaux récréatives et de consommation (au nom de BMAA ELISA). Ce kit est destiné uniquement pour une application dans les laboratoires de recherche. Ce test ELISA est basé sur la compétition entre la toxine BMAA présente dans l'échantillon d'eau et un analogue HRP-BMAA pour les anticorps spécifiques présents au fond du puits de la plaque. Après l'ajout de tous les réactifs, une coloration bleue inversement proportionnelle à la concentration en BMAA présente dans l'échantillon d'eau apparaît. L'intensité de cette coloration, lue à l'aide d'un spectrophotomètre, permet de déterminer la concentration en BMAA. Selon le fournisseur Abraxis LLC, le seuil de détection de ce kit est estimé à 4 $\mu g.L^{-1}$ et son coefficient de variation lié à sa reproductibilité est inférieur à 15%.Le nombre restreint de kit ELISA permettant l'analyse de la BMAA actuellement disponible sur le marché peut être expliqué par le fait que l'analyse de cette toxine est une problématique très récente.

Parmi les 7 laboratoires analysant de la toxine BMAA contactés et ayant répondus à l'enquête, aucun laboratoires n'utilisent les méthodes immunologiques de type ELISA pour la détection et la quantification de cette toxine.

5.3.3.3 Cylindrospermopsine

À ce jour, deux kits ELISA sont commercialisés par les compagnies Abraxis LLC et Beacon Analytical et permettent la détection et la quantification de la cylindrospermopsine dans les échantillons d'eaux récréatives et consommation. Ce test ELISA est basé sur la compétition entre la cylindrospermopsine présente dans l'échantillon d'eau et un analogue HRP-CYL pour les anticorps spécifiques présents au fond du puits de la plaque. Après l'ajout de tous les réactifs, une coloration inversement proportionnelle à la concentration en cylindrospermopsine présente dans l'échantillon d'eau apparaît. L'intensité de cette coloration, lue à l'aide d'un spectrophotomètre, permet de déterminer la concentration en cylindrospermopsine. Selon les fournisseurs, les domaines de linéarité de ces kits sont compris entre 0,1 à 2 $\mu g.L^{-1}$. Concernant le kit Abraxis LLC (PN 522011), la limite de détection de ce kit est estimée à 0,04 $\mu g.L^{-1}$ et son coefficient de variation lié à sa reproductibilité est inférieur à 15%.

Parmi les 37 laboratoires analysant de la cylindrospermosine et/ou la déoxycylindrospermopsine contactés et ayant répondus à l'enquête, 18 laboratoires utilisent les méthodes immunologiques de type ELISA pour la détection et la quantification de cette toxine, et plus particulièrement le kit commercialisé par la compagnie Abraxis.

5.3.3.4 Microcystines/Nodularines

Pour l'analyse des microcystines à l'aide d'essais immunologiques de type ELISA, plusieurs kits commerciaux sont disponibles (Tableau 5.18). Selon les fournisseurs des kits, les diverses variantes de microcystines peuvent se lier de manière différente aux anticorps présents dans les puits des kits; résultant en des réactivités croisées. Ces réactivités croisées sont déterminées par les fournisseurs pour chaque variante de microcystines et sont reportées dans le manuel d'instructions. Ces valeurs de réactivités croisées permettent ensuite de déterminer la concentration totale en microcystines et de l'estimer en équivalent MC-LR. De manière générale, les domaines de linéarité de ces kits sont compris en 0 et 5,0 $\mu g.L^{-1}$ de toxine avec des seuils de détection compris entre 0,1 et 0,3 $\mu g.L^{-1}$, permettant une gestion rapide et adéquate des eaux récréatives et de consommation en respectant les seuils limites

définis par l'OMS ou les gouvernements des pays considérés. Selon l'étude menée par Triantis et al. (2010), les tests ELISA représentent une méthode de détection efficace, rapide et économique permettant de détecter les microcystines et nodularines dans les échantillons d'eaux récréatives et de consommation. Cependant, les auteurs tiennent à souligner la nécessité de tester systématiquement la performance des kits dans les conditions spécifiques et représentatives des échantillons analysés habituellement dans le laboratoire d'analyse. En effet, les auteurs ont observé des variations et interférences qui peuvent être dues aux différences de matrices entre les solutions standards permettant de calibrer les appareils et les échantillons d'eau brute. Une validation de la méthode d'analyse avant une utilisation en routine est fortement conseillée par les auteurs car elle permet de définir les niveaux de décision à prendre concernant les résultats (coefficient de variation acceptable lors d'essais en réplicats, par exemple). Un contrôle qualité, intégrant l'analyse de solutions standards différentes des solutions de calibration fournies dans le kit (fournisseur différent), et l'analyse des échantillons en réplicats permettant de déterminer la concentration exacte et de vérfier que le coefficient de déviation est compris dans les valeurs limites acceptables définies par chaque laboratoire d'analyse sont fortement reconmmandés. Comme toute méthode de détection, il est également recommandé de confirmer les résultats et d'identifier les toxines par HPLC-UV, HPLC-PDA ou LC/MS lors de résultats positifs, certains laboratoires confirment également un certain pourcentage (5 – 10%) de résultats négatifs.

Diverses études comparatives ont été réalisées sur des kits ELISA provenant de différents fournisseurs afin de déterminer leur efficacité, leur précision et leur applicabilité sur le terrain (field test ELISA kit) (Aranda-Rodriguez et Jin 2011; Brylinsky 2012; James et al. 2011). Selon l'étude réalisée par Brylinsky (2012), le kit Abraxis® Microcystins Test Strip (520022) permettant la quantification des microcystines totales et le kit Envirologix® Qualitube Kit (PNET 022) permettant la quantification des microcystines extracellulaires donnent des résultats comparables entre les essais réalisés sur le terrain (lecture visuelle par comparaison de coloration) et les analyses réalisées en laboratoire sur les mêmes kits (quantification à l'aide d'un spectrophotomètre). L'auteur recommande l'utilisation du kit ELISA provenant du fournisseur Abraxis car il permet la détermination des microcystines totales, mais il préconise cependant l'utilisation de solutions standards (vendues séparément) afin de confirmer les observations visuelles, ainsi qu'une confirmation des résultats à l'aide d'une autre technique pour les échantillons indiquant une concentration en MC supérieure à 20 $\mu g.L^{-1}$. L'étude comparative menée par Aranda-Rodriguez et Jin (2011) indique que les kits ELISA commercialisés par les compagnies Abraxis (*Microcystins Strip Test* et *Microcystin Tube Field Kit*) et Envirologix (*Qualitube Kit for Microcystins - Field test*) donnent des

résultats similaires à la méthode de quantification par LC/MS/MS utilisée comme référence. Sur les 110 échantillons analysés à l'aide du kit *ELISA Microcystins Strip Test* de la compagnie Abraxis, 11% des résultats se sont avérés être des faux négatifs (0,5 – 0,8 ppb selon LC/MS/MS), et 94% des échantillons détectés entre 0,5 et 1 ppb selon le kit ELISA se sont avérés être des faux-positifs. Pour des concentrations en toxines plus élevées (teneurs estimées entre 1 à 5 ppb selon le kit ELISA), le nombre de faux-positifs est moins important. Dans le cas du kit *Microcystin Tube Field* commercialisé par la compagnie Abraxis, les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus par la méthode de référence, excepté pour trois échantillons (2 sur-estimations et 1 sous-estimation). Selon ces auteurs, ce kit semble être une bonne solution pour la détection et la quantification des MCs sur le terrain. Le kit *Qualitube Kit for Microcystins - Field test* commercialisé par la compagnie Envirologix, quant-à lui, ne semble pas être adapté pour une utilisation sur le terrain. En effet, en raison de la difficulté de comparaison visuelle entre les solutions standards permettant une détermination semi-quantitative des toxines et les échantillons, de nombreux faux-positifs (69% des cas sur les 50 échantillons testés) ont été obtenus pouvant entraîner une mauvaise gestion des eaux récréatives (fermeture prématurée des zones concernées). Une quantification en laboratoire à l'aide d'un spectrophotomètre donne cependant des résultats plus fiables (Aranda-Rodriguez et Jin 2011).

Des études ont été réalisés par Bagatelle® afin d'évaluer la performance de certains kits commerciaux ELISA de la compagnie Abraxis (*Microcystins/Nodularins Plate Assay Kit (96T)*; *Microcystin-DM ELISA Plate Kit* et *Abraxis Microcystin Tube Kit (40T)*) et de la compagnie Beacon (*Microcystin Plate Kit* et *Microcystin Tube Kit*) pour la détection et/ou la quantification de microcystines dans des eaux récréatives (James et al. 2011; USEPA 2012).



Figure 5.7 Photographie des kits commerciaux *Microcystins/Nodularins ELISA kit* et *Microcystins Test Strip* provenant du fournisseur *Abraxis*

Cette étude a permis d’évaluer plusieurs paramètres importants tels que:

- La **précision** : comparaison des résultats ELISA avec une autre technique LC/MS/MS
- La **répétabilité** : réalisation d’essais en triplicats;
- La **linéarité** : analyse de solutions standards à des concentrations différentes;
- La **limite de détection (LD)** : analyse d’une solution standard (concentration cinq fois inférieure à la LD donnée par le fournisseur) en réplicats;
- La **reproductibilité** des kits : comparaison des résultats obtenus pour un même échantillon avec des kits ELISA ayant des numéros de série différents.

Les résultats de cette étude sont disponibles sur le site de l’USEPA à l’adresse suivante : http ://www.epa.gov/nrmrl/std/etv/vt-ams.html#itkm et un résumé est présenté au Tableau 5.19. Suite à l’étude réalisée par James et al. (2011), les différents kits commerciaux évalués ont été approuvés par l’US EPA.

Tableau 5.19 Performances de certains kits commerciaux ELISA pour la détection et la quantification des microcystines évaluées par Bagatelle® (d'après USEPA, 2012)

Fournisseur	Nom du kit	Précision (% déviation)	Justesse (% déviation)	Linéarité (R^2)	LD (ppb)	Répétabilité (% déviation)	Reproductibilité (% déviation)
Abraxis	*Microcystin ADDA Plate*	- 45 à 58	5 à 45	0,91	0,14	3 à 28	0 à 13
Abraxis	*Microcystin DM Plate*	24 à 94	2 à 11	0,99	0,11	3,5 à 6,5	1 à 10
Abraxis	*Microcystin Strip*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Beacon	*Microcystin Plate*	16 à 81	1 à 15	0,99	0,15	2,3 à 18	4 à 14
Beacon	*Microcystin Tube*	-76 à 21	3 à 10	0,98	0,18	2,6 à 98	-11 à 14
Zeu-Immunotec	*Microcystest Plate*	20 à 280	1 à 13	0,95	0,24	1,6 à 6,9	0 à 25

Parmi les 78 laboratoires analysant les microcystines et/ou les nodularines contactés et ayant répondu à l'enquête, 37 laboratoires utilisent les méthodes immunologiques de type ELISA pour la détection et la quantification de ces toxines (Tableau 5.20). Les kits les plus fréquemment utilisés sont les suivants :

- *Kit Abraxis® ADDA-Specific;*
- *Kit Abraxis® Microcystins ELISA kit;*
- *Kit Envirologix®*.

Les techniques immunologiques de type ELISA sont très employées à travers le monde pour déterminer la présence de cyanotoxines et, plus particulièrement, les microcystines afin d'assurer un suivi des lacs, des plans d'eau et des réservoirs (Descy et al. 2009; Eldridge et al. 2012; Graham et al. 2008, Johnson 1999; Prendergast et Foster 2010). Par exemple, en 2007, lors de l'étude de caractérisation des lacs américains concernant la présence de cyanotoxines réalisée par le USEPA (« *2007 EPA National Lake Assessment* »), la détermination ainsi que la quantification des MCs totales ont été réalisées sur près de 1 150 échantillons à l'aide de kits ELISA. Afin d'assurer la qualité des résultats obtenus à l'aide de ces kits ELISA, une confimation à l'aide d'une technique chromatographique (LC/MS/MS) a été réalisée sur 2% des échantillons. Entre 2004 et 2006, dans l'état du Missouri, le suivi de 177 résevoirs d'eau a été réalisé à l'aide de kits ELISA (Envirogard® en 2004 puis *Abraxis® – Adda Specific* en 2005-2006). Les auteurs ont observés des résultats similaires pour les différents réservoirs d'eau et ce quelque soit le kit ELISA utilisé (Graham et al. 2008). Dans la région de la rivière Klamath, le suivi des différents réservoirs a été réalisé par le laboratoire de l'US EPA Région 9, basé à Cincinnati (analyse des MCs). L'analyse des microcystines dans les échantillons d'eau a été éalisée à l'aide des kits Envirologix Quanti-Plate kit (LD = 0,18 $\mu g.L^{-1}$) (Kanz 2008; Prendergast et Foster 2012). Dans la région de l'Oregon, le suivi du Lac Klamath a été réalisé entre 2007 et 2009 par le « Columbia Environmental Research Center » à l'aide de kit ELISA provenant du fournisseur Abraxis® (*kit Abraxis® Adda-specific PN 520011*) (Eldridge et al. 2012). Dans le cadre du *« New Hampshire Lakes Lay Monitoring Program »*, les concentrations en MCs ont été déterminées à l'aide de techniques immunologiques de type ELISA. Afin de déterminer la concentration en MCs totales, les échantillons ont subi trois cycles de congélation-décongélation, suivis par une filtration et une quantification grâce à un kit ELISA (*Wako BioProducts*, Richmond, VA, USA). Pour les échantillons peu concentrés (en dessous de la limite de détection), une concentration des MCs a été réalisée en évaporant à sec les échantillons après les cycles de congélation-décongélation, puis en récupérant

l'échantillon dans 0,5 mL d'une solution contenant 1,5 mM de KH_2PO_4, 8,1 mM de Na_2HPO_4, 0,137 mM de NaCl et 2,7 mM de KCl (Johnson 1999).

La méthode immunologique ELISA a également été utilisée afin de permettre un suivi rapide et efficace de cinq plans d'eau en Belgique, la détermination de la présence de MC-LR, MC-RR, MC-YR et des nodularines a été réalisée à l'aide de kits ELISA par le laboratoire de l'Université de Dundee (Ecosse) (Descy et al. 2009).

5.3.3.5 Saxitoxines

À notre connaissance, il n'existe, à ce jour, que trois kits commercialisés pour le dosage des saxitoxines. Les compagnies Abraxis LLC (Saxitoxins (PSP) Elisa Microtiter Plate) et Bioscientific (MaxSignal Saxitoxin ELISA) produisent un kit permettant la détection et la quantification des saxitoxines présentes dans les eaux récréatives et de consommation, et la compagnie R-BioPharm (Ridascreen fast saxitoxin test) pour les saxitocines dans les fruits de mer (Cusisk et Sayer 2013). Ce test ELISA est basé sur la reconnaissance des saxitoxines par des anticorps spécifiques. Lorsque des saxitoxines sont présentes dans l'échantillon, ces toxines compétitionnent avec un conjugué enzyme-saxitoxine pour les sites de fixation des anticorps anti-saxitoxine de lapin présents en solution. Les anticorps de saxitoxine sont ensuite fixés par un second anticoprs immobilisé sur la plaque et présent dans chacun des puits. Après une étape de rinçage et l'ajout du substrat, une coloration bleue apparaît, et son intensité, lue à l'aide d'un spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à la concentration en saxitoxines. Selon le fournisseur Abraxis LLC, le domaine de linéarité de ce kit est compris entre 0,02 et 0,4 $\mu g.L^{-1}$, son seuil de détection est estimé à 0,015 $\mu g.L^{-1}$, et son coefficient de variation lié à sa reproductibilité est inférieur à 15% (ISSC 2010). L'un des incovénients liés à la détection et la quantification des saxitoxines par les tests ELISA est la réactivité croisée avec les différentes variantes, qui n'est pas toujours corrélée avec la toxicité de ces variantes. En effet, les variantes décarbamoyle et N1-hydroxylées sont très toxiques, elles ne sont cependant pas détectées par ces kits ELISA, entraînant un risque de sous-estimation de la toxicité totale par les saxitoxines.. Par conséquent, les auteurs recommandent de ne pas utiliser ces kits commerciaux pour la quantification des saxitoxines, ils représentent cependant des outils efficaces pour la détection des saxitoxines (Cusisk et Sayer 2013).

Un outil prometteur de détection qualitiative des saxitoxines est actuellement en cours de développement par la compagnie Jellett Rapid Testying Ltd. Cet outil immunochromatographique « *Jellet Rapid Test for PSP detects* » est commercialisé depuis de nombreuses années pour la détection

de toxines (PSP) présentes dans le phytoplancton ou dans des fruits de mer. Il est basé sur la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre les différentes variantes de saxitoxines et permet d'obtenir une bonne réactivité croisée (représentative de la toxicité des toxines), et par conséquent des résultats qualitatifs fiables. Selon les fournisseurs de cet outil, la limite de détection des saxitoxines est estimée à 20 $ng.L^{-1}$, bien en-dessous des concentrations seuils ou décisionnelles définies par les différents pays. L'application de cet outil aux échantillons d'eau brute ou de biomasse algale est en cours de validation par les fournisseurs de cet outil. Dans le cas d'échantillons d'eau brute, les fournisseurs préconisent une concentration de l'échantillon avant l'analyse alors que dans le cas de biomasse algale, une étape de filtration suivie par une extraction des toxines intra-cellulaires en présence d'acide chlorhydrique (0,1 M) à 100°C sont recommandées avant l'analyse.

Parmi les 28 laboratoires analysant les saxitoxines contactés et ayant répondus à l'enquête, 15 laboratoires utilisent les méthodes immunologiques de type ELISA pour la détection et la quantification des saxitoxines présentes dans les eaux récréatives et/ou de consommation.

Tableau 5.20 Récapitulatif des conditions opératoires utilisées par les laboratoires contactés réalisant l'analyse de l'anatoxine-a, de la cylindrospermopsine, des microcytines/nodularines et/ou des saxitoxines à l'aide de méthodes immunologiques de type ELISA (d'après les réponses aux questionnaires)

Toxine analysée	Pays	Code Laboratoire	Matériel	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût	Méthode référence
ATX-a	Espagne	21	n.c.*	n.c.	n.c.	2 j	30 €	n.c.
	France	28	n.c.	Sigma Aldrich	n.c.	1 j	n.c.	n.c.
	Grèce	43	Kit Abraxis	Abraxis et Sigma Aldrich	LD =0,005 ppb; LQ = 0,006 ppb	n.c.	n.c.	Méthode interne
	Pologne	65	n.c.	Alexis, Sigma Aldrich	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
	Portugal	66	Kit Abraxis	n.c.	LD = 0,3 $\mu g.mL^{-1}$; LQ = 0,5 $\mu g.mL^{-1}$	n.c.	20 - 100 € par échantillon	Méthode interne
	USA	81	Kit Elisa Abraxis	Solution standard présente dans le kit	LD = 0,15 ppb	n.c.	n.c.	n.c.
	USA	83	n.c.	Sigma Aldrich	LD = 0,02 ppb	2 j	350 $	Méthode interne
CYL	Brésil	11	Kit Elisa Beacon Analytical System	Solution standard NRC (Canada)	LD = 0,6 ppb; LQ = 1,0 ppb	56 h	119 R$	n.c.
	Espagne	21	n.c.	n.c.	n.c.	2 j	30 €	n.c.
	France	28	n.c.	n.c.	n.c.	1 j	n.c.	n.c.
	Grèce	43	Kit Envirologix ou kit Abraxis	Abraxis et Sigma Aldrich	LD = 0,005 ppb ; LQ = 0,006 ppb	n.c.	n.c.	Méthode interne

Toxine analysée	Pays	Code Laboratoire	Matériel	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût	Méthode référence
CYL	Grèce	44	Kit ELISA Abraxis 522011	n.c.	LD = 0,04 ppb	24h	700 € /40 éch.	n.c.
	Grèce	45	Kit Abraxis, 522011 (Sous calibration)	Solution Standard fournie dans le kit	LD = 0,04-2,0 $ng.mL^{-1}$	7 - 10 j	1 200 € pour 96 positions	Chorus I (1999, 2001) et les instructions du fournisseur du kit ELISA
	Norvège	55	Kit Abraxis	n.c.	n.c.	4 h par série d'échantillons	500 € par kit ELISA	Méthode du fournisseur du kit ELISA
	Pologne	65	Kit Abraxis	Alexis, Sigma Aldrich	n.c.	n.c.	n.c.	Meriluoto et Codd (2005)
	Portugal	66	Kit Abraxis	n.c.	LD = 0,1-0,3 $\mu g.mL^{-1}$; LQ = 0,3-0,5 $\mu g.mL^{-1}$	n.c.	20 - 100 € par échantillon	n.c.
	République Tchèque	67	ELISA: kit Abraxis	n.c.	LD = 0,1 ppb (injection: 10 µL)	1 j	100 US $	n.c.
	Sri Lanka	71	ELISA: Abraxis (Microtiter Plate)	Sigma Aldrich	n.c.	2 - 3 j	n.c.	n.c.
	USA	81	Kit Elisa Abraxis	Solution standard présente dans le kit	LD = 0,15 ppb	n.c.	n.c.	n.c.
	USA	82	Kit ELISA: Abraxis	NRC, Sigma Aldrich, Enzo, Marbionc	LD = 0,05 ppb; LQ = 0,10 ppb	24 -72 h	100 - 400$ par analyte	Méthode interne

Toxine analysée	Pays	Code Laboratoire	Matériel	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût	Méthode référence
CYL	USA	83	n.c.	Sigma Aldrich	LD = 0,05 ppb	2 j	350 $	Méthode interne
	USA	84	Kit Abraxis	Abraxis	LD = 0,04 ppb	n.c.	n.c.	n.c.
	USA	86	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Méthode en cours de développement
	USA	90	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	75$ par échantillon	n.c.
	USA	92	Kit Abraxis	n.c.	LD = 0,05 ppb	n.c.	n.c.	n.c.
MCs/NODs	Afrique du Sud	1	Kit ELISA Envirologix	Fournie dans le kit ELISA	LD = 0,18 ppb; LQ = 2,5 ppb 2h30 - 3h par échantillon	95 CAD$	Méthode fournie dans le kit	
	Autriche	10	n.c.	CyanoBiotech GmbH	LD = 1,0 ppb	n.c.	50 €	n.c.
	Brésil	11	Kit Elisa Beacon Analytical System	Solution standard Abraxis	LD = 0,1 ppb ; LQ = 0,5 ppb	28 h	179 R$	n.c.
	Bulgarie	12	Kit ELISA Abraxis	Incluses dans les kits ELISA	LD = 0,1 ppb	n.c.	n.c.	Tevena et al. 2009
	Espagne	21	n.c.	n.c.	n.c.	2 j	30 €	n.c.
	Finlande	24	n.c.	NOD-R and MC-LR : DHI Denmark and Åbo Akademi University (Finland)	LD = 0,5 ng pour NOD-R et MC-LR	1h	10-15 €	Méthode interne
	France	28	n.c.	n.c.	n.c.	1 j	n.c.	n.c.

Toxine analysée	Pays	Code Laboratoire	Matériel	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût	Méthode référence
MCs/NODs	France	30	Kit Abraxis Microcystin-Adda Specific (PN 520011)	0 - 5,0 MC-LR + Contrôle à 0,75 ± 0,185 ppb	0,1 ppb MC-LR	2 h 30 pour 40 échantillons	582 € pour 40 échantillons	n.c.
	France	33	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	50 €	Mode opératoire du fournisseur de kit ELISA
	Grèce	43	kits Envirologix, Abraxis	MC-LR, MC-RR et MC-YR : Sigma-Aldrich, MC-LA et NOD: Abraxis, DHI Water	LD = 0,002-0,005 ppb ; LQ = 0,006 ppb	n.c.	n.c.	n.c.
	Grèce	44	Kit ELISA Abraxis 520011	n.c.	LD = 0,1 ppb MC-LR	24h	800 € pour 40 éch.	n.c.
	Grèce	45	Kit Abraxis Microcystin (520011, USA)	Solution Standard fournie dans le kit	0,02-0,07 $ng.mL^{-1}$	7 - 10 j	1 200 € pour 96 positions	Chorus I (1999, 2001) et les instructions du fournisseur du kit ELISA
	Macédoine	53	Kit ELISA Abraxis - Microcystins, ELISA Kit PN 520012	Solution Standard fournie dans le kit	n.c.	1 j	25 US$ par échantillon	Méthode du fournisseur du kit ELISA - Microcystins-DM ELISA (Microtiter Plate)

Toxine analysée	Pays	Code Laboratoire	Matériel	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût	Méthode référence
MCs/NODs	Namibie	54	Kit ELISA Abraxis 'Microcystins Strip Kit'	n.c.	n.c.	1 h	300 € par échantillon	Méthode du fournisseur du kit ELISA
	Norvège	55	Kit Abraxis	n.c.	n.c.	4 h par série d'échantillons	500 € par kit ELISA	Méthode du fournisseur du kit ELISA
	Nouvelle-Zélande	59	n.c.	n.c.	n.c.	24 h	n.c.	n.c.
	Pays-Bas	61	Kit ELISA Envirogard	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
	Pologne	63	Kit EnviriGard Microcistin Plate - 96 test puits	n.c.	n.c.	n.c.	800 - 850 US $ par kit	Méthode du fournisseur du kit ELISA
	Pologne	64	Kit Envirogard	Enzo Life Sciences	LD = 0,2 ppb	2 j	50 €	n.c.
	Pologne	65	Kit 4. Strategic diagnostics inc. USA	Alexis, Sigma Aldrich	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
	Portugal	66	Kit Abraxis		LD = 0,1-0,3 $\mu g.mL^{-1}$; LQ = 0,3-0,5 $\mu g.mL^{-1}$	n.c.	20 - 100 € par échantillon	n.c.

Toxine analysée	Pays	Code Laboratoire	Matériel	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût	Méthode référence
MCs/NODs	République Tchèque	67	Kit Abraxis, Envirologix et une comapgnie tchèque (Vidia) - En routine, utilisation de kit développé par le laboratoire	n.c.	LD = 0,1 ppb (injection: 10 µL)	1 j	100 US $	Méthode interne
	Royaume-Uni	68	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
	Taïwan	76	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
	Turquie	77	n.c.	n.c.	n.c.	1 j	n.c.	n.c.
	USA	81	Kit Elisa Abraxis	Solution standard présente dans le kit	LD = 0,15 ppb	n.c.	n.c.	n.c.
	USA	82	Kit ELISA Abraxis 520011 et Spectromètre Stat Fox 303	NRC, Sigma Aldrich, Enzo, Marbionc	LD = 0,15 ppb	24 - 72 h	100 - 400$ par analyte	n.c.
	USA	83	n.c.	Sigma Aldrich	LD = 0,16 ppb	2 j	350 $	Méthode interne

Toxine analysée	Pays	Code Laboratoire	Matériel	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût	Méthode référence
MCs/NODs	USA	84	Kits Envirogard ou Abraxis (Abraxis-Adda specific)	MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LW, MC-RR: Calbiochem; MC-YR: Sigma; MC-LY, NOD: Abraxis	LD = 0,1 ppb	n.c.	n.c.	n.c.
	USA	85	Kit Abraxis Microcystin ADDA	Solution standards Alexis Biomedicals	LD = 0,10 ppb; LQ = 0,15 ppb	3 h	65 US$	Instruction du fournisseur de kit Abraxis
	USA	86	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Méthode en cours de développement
	USA	87	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Méthode en cours de développement
	USA	90	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	75$ par échantillon	n.c.
	USA	91	Kit Envirologix	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
	USA	92	Kit Abraxis Microcystin-Adda Specific	n.c.	LD = 0,1 ppb	n.c.	n.c.	n.c.
	USA	93	Kit Envirologix Inc. N° EOP 022	n.c.	LD = 0,5 ppb	n.c.	n.c.	n.c.

Toxine analysée	Pays	Code Laboratoire	Matériel	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût	Méthode référence
MCs/NODs	USA	96	Kit ELISA Envirologix - Microcystin-DM	Incluses dans le kit ELISA	n.c.	n.c.	n.c.	Manuel du fournisseur de kit
STX	Brésil	11	Kit Elisa Beacon Analytical System	Solution standard NRC (Canada)	LD = 1,0 ppb; LQ = 6,0 ppb	59 h	140 R$	n.c.
	Bulgarie	12	Kit ELISA R-Biophram	Incluses dans les kits ELISA	LD= 0,01 ppb	n.c.	n.c.	Tevena et al. 2009
	Espagne	21	n.c.	n.c.	n.c.	2 j	30 €	n.c.
	France	28	n.c.	n.c.	n.c.	1 j		n.c.
	Japon	50	n.c.	Fournies dans le kit ELISA ou par le gouvernement	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
	Norvège	55	Kit Abraxis	n.c.	n.c.	4 h par série d'échantillons	500 € par kit ELISA	Méthode du fournisseur du kit ELISA
	Nouvelle-Zélande	56	Kit Alexis	n.c.	0,1 $ng.mL^{-1}$	6 min par échantillon	n.c.	Méthode interne certifiée (sauf STX)
	Nouvelle-Zélande	59	n.c.	n.c.	n.c.	24 h	n.c.	n.c.
	Pologne	65	kit Abraxis	Alexis, Sigma Aldrich	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

Toxine analysée	Pays	Code Laboratoire	Matériel	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût	Méthode référence
STX	USA	81	Kit Abraxis	Solution standard présente dans le kit	LD = 0,15 ppb	n.c.	n.c.	n.c.
	USA	82	Kit Abraxis	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
	USA	83	n.c.	NRC, Sigma Aldrich, Enzo, Marbionc	LD = 0,02 ppb	24 - 72 h	100 - 400$ par analyte	n.c.
	USA	84	Kit Abraxis	n.c.	LD = 0,02 ppb	n.c.	n.c.	n.c.
	USA	86	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Méthode en cours de développement
	USA	90	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	75 $ par échantillon	n.c.

**n.c. : non communiqué.*

5.3.4 Chromatographie liquide (HPLC) couplé à un détecteur UV ou un spectromètre de masse

Les méthodes chromatographiques sont mondialement reconnues pour leur efficacité dans l'identification et la quantification des cyanotoxines (anatoxine-a, BMAA, cylindrospermopsines, microcystines, nodularines, saxitoxines) (Afssa et Afsset 2006; Nicholson et Burch 2001). Différents modes de détection peuvent être couplés à l'appareil de chromatographie liquide (HPLC). Parmi les modes de détection les plus utilisés, on retrouve les spectrophotomètres UV, les détecteurs à barrettes de diode (PDA), les détecteurs à fluorescence, et les spectromètres de masse (MS). La détection, l'identification et la quantification de l'anatoxine-a, de la cylindrospermospine, des microcystines et des nodularines peuvent être réalisées à l'aide de spectrophotomètre-UV en se basant sur les temps de rétention, le spectre-UV ainsi que le maximum d'absorbance obtenus pour des solutions standards commerciales (Lecouffe 2013). La détection par fluorescence après dérivation de l'anatoxine-a en présence de 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole ou l'oxydation des saxitoxines en présence de péiodate ou de peroxyde d'hydrogène permet de réduire les effets de matrices liés à la présence de contaminants. En effet, les molécules fluorescentes sont beaucoup moins importantes que celles absorbant le rayonnement UV. Les principaux avantages liés à l'utilisation d'un spectromètre de masse comme détecteur est sa capacité à détecter plusieurs types de toxines en même temps, sa grande spécificité et sa sensibilité, sa vitesse d'exécution et son élimination des faux-positifs par confirmation de l'identité de la molécule avec les spectres de masse. Cependant, ces technologies requièrent des équipements très coûteux, un haut niveau d'expertise des techniciens ainsi que l'utilisation de solutions standards pour calibrer l'appareil (pas toujours disponibles pour certaines toxines).

5.3.4.1 Anatoxine-a

HPLC-UV :

À ce jour, il n'existe aucun protocole international (norme ISO) pour la détection, l'identification et la quantification de l'anatoxine-a, de l'anatoxine-a(S) ou de l'homo-anatoxine.

Au niveau Européen, le protocole opératoire standard établi par Metcalf et Codd (2005d) (SOP_TOXIC_UDU_08F) préconise les conditions suivantes pour la détection, l'identification et la quantification de l'anatoxine-a par HPLC-UV:

- Pré-colonne HPLC : Une pré-colonne compatible avec la colonne C18 sélectionnée est requise pour protéger la colonne. Cette pré-colonne doit être remplacée dès que la forme des pics se déteriore;
- Colonne HPLC : Colonne phase inverse C18 de type Phenomenex Luna (150 x 4,6 mm, 3 µm particules);
- Volume injecté : 10 à 25 µL;
- Four : Température fixée à 40°C;
- Phase mobile – Solvant A : Eau MilliQ + 0,1% TFA (v/v);
- Phase mobile – Solvant B : Acétonitrile grade HPLC + 0,1% TFA (v/v);
- Débit de la phase mobile : 1 mL.min-1 pour colonne Phenomenex Luna (150 x 4,6 mm, 3 µm particules;
- Détection : UV – Longueur d'onde fixée à 227 nm.

En Afrique du Sud, le manuel regroupant les méthodes d'échantillonnage, de détection et d'identification et de quantification de l'anatoxine-a établi par Swanepoel et al. (2008) préconise les conditions suivantes:

- Pré-colonne HPLC : Une pré-colonne compatible avec la colonne C18 sélectionnée est requise pour protéger la colonne;
- Colonne HPLC : Colonne phase inverse C18 ou ODS-2 (250 x 2,0 à 4,6 mm, 3 à 5 µm particules);
- Volume injecté : Le volume à injecter doit être ajusté en fonction des dimensions de la colonne sélectionnée afin d'obtenir une séparation optimale et une bonne résolution des pics;
- Four : Température fixée à 40°C;
- Phase mobile – Solvant A : Acétonitrile grade HPLC + 0,05% TFA (v/v) - Ajouter 800 mL d'acétonitrile grade HPLC, 500 µL de TFA grade HPLC et 10 mL d'eau Milli-Q dans une fiole jaugée de 1 L puis compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'acétonitrile. Dégazer puis filtrer la solution avant utilisation. La solution peut être conservée à température ambiante pendant trois semaines;
- Phase mobile – Solvant B : Eau Milli-Q + 0,05% TFA (v/v) - Ajouter 800 mL d'eau Milli-Q, 500 µL de TFA grade HPLC et 10 mL d'acétonitrile grade HPLC dans une fiole jaugée de 1 L puis compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau Milli-Q. Dégazer puis filtrer la solution avant utilisation. La solution peut être conservée à température ambiante pendant deux semaines;

- Débit de la phase mobile : Le débit de la phase mobile doit être ajusté entre 0,3 et 1,0 mL.min-1 en fonction des dimensions de la colonne sélectionnée afin d'obtenir une séparation optimale et une bonne résolution des pics;
- Détection : UV – Longueur d'onde fixée à 227 nm. Un scan des longueurs situées entre 200 et 300 nm est recommandé pour confirmer l'identité des toxines.

Lors de l'analyse de l'anatoxine-a, l'utilisation d'une colonne HPLC phase inverse de type C18 peut s'avérer problématique pour les échantillons d'eau contenant de la phénylalanine car ce composé co-élue avec l'anatoxine-a, rendant l'intégration du pic difficile voire impossible (Oehrle et al. 2010). Des études ont montré que la détection par spectrométrie de masse ou fluorescence après dérivation de l'anatoxine-a par ajout de 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole permettent d'augmenter la sensibilité de la détection et de la quantification (Afssa et Afsset, 2006). James et al. (1998) préconisent de réaliser l'étape de dérivation après les étapes de filtration, lyse cellulaire et de purification sur cartouche SPE C18 ou cationique CWX. L'étape de dérivation de l'anatoxine-a et de ses produits de dégradation est réalisée après récupération de l'extrait dans 100 µL d'une solution de borate de sodium (0,1 M) puis ajout de 50 µL d'une solution de 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (1 M). Le mélange doit ensuite laisser à réagirau noir et à température ambiante pendant 10 min. Une solution d'acide chlorhydrique (1 M, 50 µL) est ensuite ajoutée afin d'arrêter la réaction de dérivation. La solution obtenue peut ensuite être analysée par HPLC-Fluorescence à l'aide d'une colonne Ultremex ou Prodigy C18 (250 x 3,2 mm; 5 µm particules, Phenomenex) éluée en presence d'une solution d'eau:acétonitrile (55:45) et détection fluorométrique de l'anatoxine-a dérivée (λex = 470 nm, λem = 530 nm). Selon Rawn et al. (2005), l'addition de o-phtaldialdéhyde et de mercaptoéthanol à l'extrait avant l'étape de dérivation par ajout de 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole facilite l'enlèvement des amines primaires présentes dans l'échantillon d'eau brute, réduisant ainsi le bruit de fond lors de l'analyse des dérivés de 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole par fluorescence. L'amélioration de l'allure des chromatogrammes obtenus par fluorescence permet d'atteindre des limites de détection plus basses (approximativement 50 $\mu g.kg^{-1}$).

Parmi les 33 laboratoires contactés analysant l'anatoxine-a et ayant répondus à l'enquête, 31 laboratoires utilisent les méthodes chromatographiques en phase liquide pour l'identification et la quantification de l'anatoxine-a présente dans les eaux brutes. De manière générale, les laboratoires

d'analyse utilisent une colonne de type C18 et une détection par spectromètre UV ou MS, seuls 3 laboratoires utilisent la détection par fluorescence.

5.3.4.2 BMAA

À ce jour, il n'existe aucun protocole standard défini au niveau International (norme ISO) ou National décrivant les conditions opératoires permettant la détection, l'identification et la quantification de la ß-N-méthylamino-L-alamine (BMAA).

De manière générale, les colonnes en phase inverse de type C18 sont communément utilisées par les laboratoires d'analyse pour la détection, l'identification et la quantification de la BMAA. Cependant, la détection directe de la BMAA sans étape préalable de dérivation permettant de former des composés fluorescents plus facilement détectables est beaucoup plus difficile sur les colonnes de type C18. Kubo et al. (2008) ont testés différentes colonnes C18 pour l'analyse de la BMAA, et les résultats obtenus indiquent que certaines colonnes C18 retiennent peu ou pas du tout la BMAA, entaînant l'apparition de larges pics difficiles à intégrer. Par conséquent, les auteurs de cette étude préconisent l'utilisation d'une colonne de type hydrophilique HILIC, et plus particulièrement la colonne TSK-gel Amide-80 (Tosoh, Japon). L'un des avantages liés à l'utilisation de colonnes HILIC est que ce type de colonne favorise la séparation de composés fortement polaires, améliorant ainsi l'allure des chromatogrammes lors de l'analyse de BMAA dans les échantillons d'eau brute (Kubo et al. 2008 ; Li et al. 2011). La méthode développée par Rosen et al. (2008) semble très satisfaisante en termes de justesse (taux de récupération compris entre 95 et 109%) et de reproductibilité (coefficients de variation compris entre 1 et 6%). Dans cette étude, Rosen et al. (2008) préconisent l'utilisation d'une colonne ZIC-HILIC (50 x 2,1 mm ou 150 x 2,1 mm, 5µm particules, Sequant) ainsi qu'une solution acétonitrile:eau acidifiée par de l'acide formique 60 mM (65:35 ou 70:30, v/v) comme solvant d'élution à un débit compris entre 0,4 et 0,5 $mL.min^{-1}$.

Tableau 5.21 Récapitulatif des conditions opératoires utilisées par les laboratoires contactés réalisant l'analyse de l'anatoixine-a et/ou de ses produits de dégradation à l'aide de méthodes chromatographiques (d'après les réponses aux questionnaires)

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
Argentine	3	HPLC/UV ou LC/MS	Colonne Polaris C18-A (5 µm particules, Varian)	n.c.*	Solution Standard Sigma-Aldrich	LD = 0,04 ppb, LQ = 0,12 ppb	1 semaine	160 US $	Ame et al. (2010)
Australie	7	HPLC/UV ou LC/MS/MS	Colonne C18	n.c.	Solution NRC Canada	LD = 0,5 ppb	< 30 min	105 - 150 AUD	n.c.
Australie	8	LC/MS/MS	n.c.	n.c.	n.c.	LD = 0,1 ppb	n.c.	n.c.	Méthode interne accréditée NATA
Canada	18	HILIC/MS/MS	Colonne TosoHaas Amide 80 (150 x 2,1 mm, 3µm particules)	n.c.	CRMs	LD = 250 $ng.mL^{-1}$, LQ = 750 $ng.mL^{-1}$	n.c.	n.c.	Méthode interne non réalisée en routine pour le moment.
Espagne	20	LC/MS ou LC/MS/MS	n.c.	n.c.	Alexis (Suisse), LGC Standards, Sigma-Aldrich, Cyano Biotech GmbH	LD (E) = 0,0002-0,07 $mg.L^{-1}$; LD (I) = 0,02-0,4 ppb	Préparation: 2 j; Analyse: 15 - 45 min	100 – 500 €	n.c.
Espagne	21	HPLC/PDA; HPLC/MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	2 j	30 €	n.c.
France	27	UHPLC/MS/MS	Colonne Acquity BEH C18 (Waters)	n.c.	COGER	LD = 0,1 ppb	48 h à 5 j	120 euros (fraction totale)	Méthode interne

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
France	28	HPLC-PDA ou LC/MS	Colonne Equisil BDS C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm particules)	Eau/Acétonitrile (97,5/2,5) contenant NaH_2PO_4 (5mM, pH 3,5)	Sigma Aldrich	n.c.	1 à 7 j		n.c.
France	29	LC/MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	24 à 48 h	350 €	n.c.
France	37	LC/MS/MS	Colonne HILIC	n.c.	Novakits	LD = 0,3 - 1 ppb	48	220 €	n.c.
Grèce	43	HPLC-UV, HPLC-PDA, LC/MS/MS	Colonne C18	n.c.	Abraxis et Sigma Aldrich	LD = 0,002-0,005 ppb, LQ = 0,006 ppb	n.c.	n.c.	Méthode interne
Italie	49	HPLC/PDA, LC/MS	HILIC	n.c.	Solution standard provenant de Sigma Aldrich	LD = 0,20 $ng.injection^{-1}$	10 min par échantillon	n.c.	Méthode interne inspirée de Codd et Meriluoto (2005)
Japon	50	LC/MS	Colonne: TOSOH Amide-80	n.c.	Sigma Aldrich	LD = 2 à 3 $pg.injection^{-1}$	3 h	n.c.	Sano et al. (2013)
Luxem-bourg	52	LC/MS	n.c.	n.c.	Enzo Life Sciences	n.c.	1 j	100 €	Méthode interne
Nouvelle-Zélande	56	LC/MS	Colonne C18	n.c.	n.c.	LD = 0,1 $ng.mL^{-1}$	6 min par échantillon	n.c.	Méthode interne
Pays-Bas	62	LC/MS/MS	Atlantis T3 (150 x 2,1 mm, 3 µm particules, Waters)	Solvant A: MeOH 1% (5 mM acétate d'ammonium); Solvant B: MeOH 90% (5 mM acétate d'ammonium)	Anatoxine-a: Enzo Life Science; Homoanatoxine-a: Novakits	n.c.	2 - 3 j	175 €	Lurling et Faassen (2012)

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
Pologne	65	HPLC-PDA, LC/MS/MS	Colonnes Luna 5u C18 (5µm particules, Phenomenex) ou Zorbax Eclipse XDB-C18, Analytical (150 x 4,6 mm, 5 µm particules)	n.c.	Alexis, Sigma Aldrich	LD = 0,3 – 1 ,5 $\mu g.cm^{-3}$	n.c.	25 - 35 €	Meriluoto et Codd (2005)
Portugal	66	HPLC/UV, HPLC/PDA, LC/MS	Colonne C18 ou HILIC	n.c.	n.c.	LD = 0,1-0,3 µg/ml; LQ = 0,3-0,5 µg/ml	n.c.	20 - 100 €	Méthode interne
Taïwan	75	LC/MS/MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	79	LC/MS/MS	Colonne Waters x-Bridge Phenyl (150 x 2,1 mm, 3,5µm particules)	n.c.	Enzolife Science	LD = 0,5 ppb; LQ = 1,0 ppb	30 min	500 US $	Méthode développée à partir de différentes sources : Florida DEP SOP et notes de Applied Biosystems Inc.
USA	80	LC/MS	Colonne Kinetex (50 x 2,1 mm, 2,6 µm particules)	n.c.	Solutions standards Abraxis ou BioTrend	LD = 0,1 ppb; LQ = 0,5 ppb	30 min	300 NZD	Takino and Kyono (2002)

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
USA	82	LC/MS/MS	Colonne HILIC	Eau/Acétonitrile/ Acide formique/ Acétate d'ammonium	n.c.	LD = 0,05 ppb; LQ = 0,10 ppb	24 -72 h	100 - 400$ par analyte	Méthode interne
USA	83	LC/MS	Colonne C18 T3 (2,1x100 mm, 3 µm particules, Waters)	n.c.	Sigma Aldrich	LD = 0,02 ppb	2 j	350 $	Méthode interne
USA	84	LC/MS/MS	Colonne dC18 (150 x 3 mm, 3 µm particules, Waters Atlantis)	n.c.	A.G. Scientific	LD = 0,02 ppb	n.c.	n.c.	n.c.
USA	85	LC/MS/MS	Colonne Waters YMC ODS-AQ, (150 x 2,0 mm, 5 µm particules)	Solvant A: Acide formique 0,1% dans Eau; Solvant B: Acide formique 0,1% dans Acétonitrile	Solution standards BIOMOL Research Laoratories Inc (EnzoLife Science)	LD = 0,05 - 0,29 ppb; LQ = 0,16 - 0,87 ppb	24 h	350 US$	Méthode interne issue de Hedman et al. (2008)
USA	88	UPLC/MS	Colonne Acquity UPLC HSS-T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm particules, Waters)	Solvant A: Eau acidifiée 0,05% TFA, Solvant B: Acétonitrile acidifié 0,05% TFA	A.G. Scientific	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	89	HPLC-Fluorométrie	n.c.	n.c.	n.c.	LD = 0,1 ppb	2 h	n.c.	n.c.

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
USA	90	HPLC-PDA	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	80 - 110$	n.c.
USA	91	HPLC-Fluorométrie	Colonne Zorbax C18	Acétonitrile : Eau (55 : 45)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	93	HPLC-Fluorométrie	Colonne C18 Ultremex ou Prodigy (250 x 3,2 mm, 5 µm particules, Phenomenex)	Acétonitrile : Eau (45 : 55)	n.c.	LD = 10 $ng.L^{-1}$	n.c.	n.c.	James et al. (1998)
USA	94	LC-(ESI)MS/MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Méthode E3450

**n.c. : non communiqué.*

Esterhuizer et Downing (2009) quant-à-eux préconisent l'utilisation d'une colonne telle que la colonne Phenomenex AAA-MS (250 x 2,0 mm), permettant la séparation des acides aminés élués en présence d'un gradient de solvants (Solvant A : Formate d'ammonium dans de l'eau (10 mM) et Solvant B : formate d'ammonium dans du MeOH (10 mM)) à un débit de 0,25 $mL.min^{-1}$. Afin de favoriser la détection de la BMAA, les auteurs recommandent de réaliser une étape de dérivation à l'aide du kit EZ:faast (Phenomenex KH0-7338), ainsi que l'ajout d'homophénylalanine comme étalon interne lors de l'étape de dérivation afin d'évaluer les pertes éventuelles de BMAA lors de la préparation de l'échantillon.

Tous les laboratoires d'analyse ayant répondu à notre questionnaire utilisent les méthodes chromatrographiques en phase liquide couplées à un spectromètre de masse (LC/MS : 2 laboratoires sur 7 – Laboratoires n° 72 et 89) ou à un tandem de spectromètre de masse (LC/MS/MS : 5 laboratoires sur 7) pour la détection et la quantification de la BMAA. D'après les réponses obtenues aux questionnaires, les laboratoires analysant la BMAA utilisent préférentiellement des colonnes en phase inverse de type C18 (3 laboratoires sur 7) comparativement aux colonnes hydrophiliques (2 laboratoires sur 7) (Tableau 5.22).

Tableau 5.22 Récapitulatif des conditions opératoires utilisées par les laboratoires contactés réalisant l'analyse de la BMAA à l'aide de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC/MS ou LC/MS/MS)

Pays	Code Laboratoire	Type de colonne	Solvant élution	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
Canada	17	Colonne C18 Hypersil BDS (100 x 2,1 mm, 5 µm particules) ou HILIC TSK-gel Amide80 (150 x 2,0 mm, 5µm particules, Tosoh Biosense Gmbh)	Solvant A: eau acidifiée par du TFA (0,05%), Solvant B: Acétonitrile	LD = 0,1 $\mu g.g^{-1}$	n.c.*	n.c.	Kubo et al. (2008); Rosén et Hellenäs, (2008)
Grèce	43	Colonne HILIC	n.c.	LD = 0,005 ppb, LQ = 0,006 ppb	n.c.	n.c.	Méthode interne
Pays-Bas	62	Colonne ZIC-HILIC (150 x 2,1 mm, 5 µm particules, Merck Sequant AB)	n.c.	n.c.	2 - 3 j	200 €	Fassen et al. (2012)

Pays	Code Laboratoire	Type de colonne	Solvant élution	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
Pologne	65	Colonne Luna 5u C18(5 µm particules, Phenomenex) ou Zorbax Eclipse XDB-C18, Analytical (150 x 4,6 mm, 5 µm particules)	n.c.	LD = 1,5 $ng.cm^{-3}$	n.c.	35 €	n.c.
Suéde	72	Colonne Acquity C18 BEH (100 x 1,7 mm)	n.c.	n.c.	2-3 j	n.c.	n.c.
USA	82	n.c.	n.c.	n.c.	24 - 72 h	100 - 400$ par analyte	n.c.
USA	89	n.c.	n.c.	LD = 0,1 ppb	2 h	n.c.	n.c.

**n.c. : non communiqué.*

5.3.4.3 Cylindrospermopsine

L'une des méthodes les plus utilisées pour l'identification et la quantification de la cylindrospermopsine est l'analyse par HPLC couplée à un détecteur ultra-violet (HPLC-UV) (Codd et al. 2005).

<u>HPLC-UV :</u>

À ce jour, il n'existe aucun protocole international (norme ISO) pour la détection, l'identification et la quantification de la cylindrospermopsine ou de la déoxycylindrospermopsine.

Au niveau Européen, le protocole opératoire standard établi par Metcalf et Codd (2005e) (SOP_TOXIC_UDU_09F) préconise les conditions suivantes pour la détection, l'identification et la quantification de la cylindrospermopsine par HPLC-UV:

- Pré-colonne HPLC : Une pré-colonne compatible avec la colonne C18 sélectionnée est requise pour protéger la colonne. Cette pré-colonne doit être remplacée dès que le la forme des pics se détériore;
- Colonne HPLC : Colonne phase inverse C18 de type Naclai Tesque Cosmosil (150 x 4,6 mm, 5 µm taille de particules)
- Volume injecté : 25 µL;
- Four : Température fixée à 40°C;
- Phase mobile – Solvant A : Eau MilliQ;
- Phase mobile – Solvant B : MeOH grade HPLC;

- Débit de la phase mobile : 1 mL.min-1 pour colonne de type Naclai Tesque Cosmosil (150 x 4,6 mm, 5 µm taille de particules);
- Détection : UV – Longueur d'onde fixée à 262 nm.

En Afrique du Sud, le manuel regroupant les méthodes d'échantillonnage, de détection et d'identification et de quantification de la cylindrospermopsine établi par Swanepoel et al. (2008) préconise d'utiliser les mêmes conditions opératoires que celles décrites pour la détection, l'identification et la quantification de l'anatoxine-a et présentées ci-dessus.

Selon l'étude comparative réalisée par Törökné et al. (2004), les méthodes de détection, d'identification et de quantification HPLC-UV utilisées par les 6 laboratoires participants (Tableau 5.23) semblent satisfaisantes en termes de répétabilité et de reproductibilité. Les différences de résultats observés semblent davantage être dues aux étapes de préparation des échantillons qui peuvent entraîner une perte ou une solubilisation de contaminants qui co-éluent, rendant la quantification des pics difficiles (surestimation de la concentration en CYL).

Parmi les 37 laboratoires contactés analysant la cylindrospermopsine et /ou la déoxy-cylindrospermopsine et ayant répondus à l'enquête, 31 laboratoires utilisent les méthodes chromatographiques en phase liquide pour l'identification et la quantification de la cylindrospermosine ou de la déoxycylindrospermopsine présente dans les eaux brutes. De manière générale, les laboratoires d'analyse utilisent une colonne de type C18 et une détection par spectromètre UV ou MS (Tableau 5.24).

Tableau 5.23 Matériels et méthodes utililisés pour la détection et la quantification de la cylindrospermopsine par 6 laboratoires participants à une étude inter-laboratoire (d'après Törökné et al. 2004)

	Participant 1	Participant 2	Participant 3	Participant 4	Participant 5	Participant 6
Type de colonne	Cosmosil C18	LiChroSpher RP18	Zorbax XDB C8	Aqua C18 125A Phenomenex	Zorbax RX-C18	Lichrosorb RP-18
Taille de particules (µm)	5	5	5	5	5	5
Dimensions colonne (mm)	150 x 4,6	250 x 4,0	150 x 2,1	250 x 4,6	250 x 4,6	250 x 4,0
Température de colonne (°C)	40	30	20	40	40	40
Volume injecté (µL)	25	100	50	100	20	5
Phase mobile	1-12% MeOH dans eau	0-50% MeOH acidifié 0,05% TFA	A: 0,2% Acide formique B: MeOH/CAN (82/18) - 95% A et 5% B	0-5% MeOH dans 10 mM tampon phosphate, pH 7	1% MeOH dans eau	0-10% MeOH dans H_3PO_4 (1%)
Débit ($mL.min^{-1}$)	1	1	0,2	1	1	0,5
Élution	Gradient	Gradient	Isocratique	Gradient	Isocratique	Gradient
Temps du run (min)	35	25	n.c.	30	10	65
Détecteur	PDA - λ = 262 nm (spectre 200-300 nm)	PDA - λ = 262 nm	UV - λ = 262 nm	PDA - λ = 270 nm	PDA - λ = 262 nm	
Quantité CYN détectée (µg)	20,5	-	-	27 ± 3,6	20	-

Tableau 5.24 Récapitulatif des conditions opératoires utilisées par les laboratoires contactés réalisant l'analyse de la cylindrospermopsine et/ou de la déoxycylindrospermopsine à l'aide de méthodes chromatographiques

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
Australie	7	HPLC/UV ou LC/MS/MS	Colonne C18	n.c.*	Solution NRC Canada	LD = 0,2 ppb	< 30 min	105 - 150 AUD	n.c.
Australie	8	LC/MS/MS	n.c.	n.c.	n.c.	LD = 0,1 ppb	n.c.	n.c.	Méthode interne accréditée NATA
Brésil	11	HPLC/PDA, LC/MS/MS	Colonne Kinetex C18 100A (50 x 2,1 mm, 2,6µm particules, Allcrom)	n.c.	Solution standard NRC (Canada)	LD = 0,6 ppb, LQ = 1,0 ppb	56 h	119 R$	Eaglesham et al. (1999)
Canada	18	HPLC/UV, HPLC/PDA, LC/MS	n.c.	n.c.	CRMs	n.c.	n.c.	n.c.	Méthode interne non réalisée en routine pour le moment.
Espagne	20	LC/MS ou LC/MS/MS	n.c.	n.c.	Alexis (Suisse), LGC Standards, Sigma-Aldrich,	LD (E) = 0,0002-0,07 $mg.L^{-1}$; LD (I) = 0,02-0,4 ppb	2 j	100 – 500 €	n.c.
Espagne	21	HPLC/PDA; LC/MS	Colonne Water Sperisorb ODS2	n.c.	n.c.	n.c.	2 j	30 €	n.c.
France	27	UHPLC/MS/MS	Colonne Acquity UPLC BEH C18 (Waters)	n.c.	COGER	LD = 2 ppb	48 h - 5 j	120 € (fraction totale)	Méthode interne
France	29	LC/MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	24 - 48 h	350 €	n.c.

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
France	37	LC/MS/MS	Colonne HILIC	n.c.	Novakits	LD = 0,3 - 1 ppb	48 h	220 €	n.c.
Grèce	43	HPLC-UV, HPLC-PDA, LC/MS/MS	Colonne C18	n.c.	Abraxis et Sigma Aldrich	LD = 0,002-0,005 ppb, LQ = 0,006 ppb	n.c.	n.c.	Méthode interne
Israël	48	HPLC-PDA	Colonne Spherisorb ODS2 (250 x 4,6 mm, 5 µm particules, Waters)	n.c.	ENZO Life Sciences	n.c.	2 - 5 j	100 $	Méthode interne
Italie	49	HPLC/PDA, LC/MS	Colonne HILIC	n.c.	Solution standard provenant de Sigma Aldrich	LD = 0.20 $ng.injection^{-1}$	10 min par échantillon	n.c.	Méthode interne développée à partir de Codd et Meriluoto (2005)
Japon	50	LC/MS	Colonne HILIC Amide-80 (Tosoh)	n.c.	NRC CRM	LD = 2 $pg.injection^{-1}$	3 h	n.c.	Kikuchi et al. (2007)
Nouvelle-Zélande	56	LC/MS	Colonne C18	n.c.	n.c.	LD = 0,1 $ng.mL^{-1}$	6 min par échantillon	n.c.	Méthode interne certifiée (sauf STX)
Pays-Bas	62	LC/MS/MS	Colonne Atlantis T3 (150 x 2,1 mm, 3µm particules, Waters)	Solvant A: MeOH 1% (5 mM acétate dammonium), Solvant B: MeOH 90% (5 mM acétate dammonium)	n.c.	n.c.	2 - 3 j	175 €	Lurling et Faassen (2012)

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
Pologne	65	HPLC-PDA, LC/MS/MS	Colonne Luna 5u (5 µm particules, Phenomenex) ou Zorbax Eclipse XDB-C18, Analytical (150 x 4,6 mm, 5 µm particules)	n.c.	Alexis, Sigma Aldrich	LD = 0,3 $\mu g.cm^{-3}$ (HPLC) et 1,5 $ng.cm^{-3}$ (LC/MS/MS)	n.c.	25 - 35 €	Meriluoto et Codd (2005)
Portugal	66	HPLC/UV, HPLC/PDA, LC/MS	Colonne C18 ou HILIC	n.c.	n.c.	LD = 0,1-0,3 $\mu g.mL^{-1}$; LQ = 0,3-0,5 $\mu g.mL^{-1}$	n.c.	20 - 100 €	Pinheiro *et* al. (2013)
République Tchèque	67	Routine: LC/MS	Colonne C18 Supelcosil ABZ (150 x 4,6 mm, 5 µm particules, Supelco)	Solvant A: MeOH : eau 1 : 99 (v/v) et Solvant B: MeOH : eau 90 : 10 (v/v), acidifié avec 5 mM acétate d'ammonium	n.c.	LD = 0,1 ppb (injection: 10 µL)	1 j	100 US $	Blahova et al. (2009)
Slovaquie	69	HPLC/PDA	Colonne Phenomenex Sinergy Fusion RP, (75 x 2,0 mm, 4 µmparticules, Phenomenex) ou Inertsil 5, C18, (250 x 4,6 mm, 5 µm particules, Varian)	n.c.	Enzo Life Sciences et Alexis Biochemical	LD = 0,42 ppb, LQ = 0,50 ppb	3 h	100 - 150 €	Bláhová et al. (2009)
Sri Lanka	71	HPLC-PDA	Colonne C18	n.c.	Sigma Aldrich	n.c.	2 - 3 j	56$	Harada et al. (1994)

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
USA	79	LC/MS/MS	Waters x-Bridge Phenyl (150 x 2,1 mm, 3,5 µm particules)	n.c.	Solution standard Enzolife Science	LD = 0,5 ppb, LQ = 1,0 ppb	30 min	500 US $	n.c.
USA	80	LC/MS	Colonne Kinetex (50 x 2,1 mm, 2,6 µm particules)	n.c.	Solutions standards Abraxis ou BioTrend	LD = 0,1 ppb, LQ = 0,5 ppb	30 min	300 NZD	n.c.
USA	82	LC/MS/MS	Colonne C18 phase inverse	Eau/Acétonitrile/Acide formique/Acétate d'ammonium	NRC, Sigma Aldrich, Enzo, Marbionc	LD = 0,05 ppb; LQ = 0,10 ppb	24 -72 h	100 - 400$ par analyte	Méthode interne
USA	83	LC/MS	Colonne C18 T3 (100 x 2,1 mm, 3 µm particules, Waters)	n.c.	Sigma Aldrich	LD = 0,05 ppb	2 j	350 $	Méthode interne
USA	84	LC/MS/MS	Colonne dC18 (150 x 3 mm, 3 µm particules, Waters Atlantis) et pré-colonne (20 x 3,9 mm, 3 µm particules, Waters Atlantis)	n.c.	Abraxis	LD = 0,04 ppb	n.c.	n.c.	n.c.
USA	85	LC/MS/MS	Colonne Waters YMC ODS-AQ (150 x 2,0 mm, 5µm particules, Waters)	Solvant A: Acide formique 0,1% dans Eau, Solvant B: Acide formique 0,1% dans Acétonitrile	Solution standards USEPA	LD = 0,05 - 0,29 ppb; LQ = 0,16 - 0,87 ppb	24 h	350 US$	Hedman et al. (2008)
USA	86	LC-MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Méthode en cours de développement

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
USA	88	UPLC/MS	Colonne Acquity UPLC HSS-T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm particules)	Solvant A: Eau acidifiée 0,05% TFA, Solvant B: Acétonitrile acidifié 0,05% TFA	Sigma Aldrich	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
USA	89	HPLC-PDA	n.c.	n.c.	n.c.	LD = 0,1 ppb	n.c.	n.c.	n.c.
USA	90	HPLC-PDA	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	80 – 110 $	n.c.
USA	93	LC/MS/MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Eaglesham et al. (1999)

**n.c. : non communiqué.*

5.3.4.4 Dermatotoxines

À ce jour, il n'existe aucun protocole standard défini au niveau International (norme ISO) ou National permettant la détection, l'identification et la quantification des dermatotoxines (lipopolysaccharides; aplysiatoxine, debromoaplysiatoxine, lyngbyatoxine-a). Actuellement, peu de laboratoires à travers le monde analysent les dermatotoxines (seulement 2 laboratoires sur les 79 laboratoires analysant les cyanotoxines et ayant répondu à la présente enquête). Le Tableau 5.25 présente les méthodes chromatographiques utilisées par ces laboratoires afin de détecter, identifier et quantifier les dermatotoxines par LC/MS/MS.

Tableau 5.25 Récapitulatif des conditions opératoires utilisées par les laboratoires contactés réalisant l'analyse des dermatotoxines à l'aide de méthodes chromatographiques (LC/MS/MS) (d'après les réponses aux questionnaires)

Pays	Code Laboratoire	Toxines analysées	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût	Méthode référence
USA	82	Dematotoxines	n.c.*	n.c.	NRC, Sigma Aldrich, Enzo	n.c.	24 -72 h	100 - 400$ par analyte	n.c.
USA	84	Lyngbyatoxine	Colonne dC18 (150 x 3 mm, 3 µm particules, Waters Atlantis) et pré-colonne (20 x 3,9 mm, 3 µm particules, Waters Atlantis)	n.c.	Calbiochem	LD = 0,02 ppb	n.c.	n.c.	Graham et al. (2008)

**n.c. : non communiqué.*

5.3.4.5 Microcystines/Nodularines

Différents protocoles ont été développés afin de détecter, identifier et quantifier les microcystines présentes dans les échantillons d'eau ainsi que dans les extraits de biomasse algale.

LC-UV :

Au niveau International, la norme ISO 20179 (2005) spécifie les conditions opératoires décrites ci-dessous pour la détection, l'identification et la quantification des microcystines:

- Pré-colonne HPLC : Une pré-colonne compatible avec la colonne C18 sélectionnée est requise pour protéger la colonne, la pression dans la pré-colonne doit être comprise entre 1 015 et 2 900 psi;
- Colonne HPLC : Colonne phase inverse C18 ayant les dimensions suivantes : Longueur : 250 mm, Diamètre interne : entre 2,0 et 4,6 mm et Taille des particules : entre 3 et 5 µm;
- Volume injecté : entre 5 et 20 µL;
- Four : Température fixée à 40°C;
- Phase mobile – Solvant A : Acétonitrile grade HPLC + 0,05% TFA. Ajouter 800 mL d'acétonitrile grade HPLC et 500 µL de TFA grade HPLC dans une fiole jaugée de 1 L puis compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'acétonitrile. Transférer la solution dans une bouteille à éluant pour HPLC et dégazer avant utilisation. La solution doit être remplacée toutes les trois semaines;
- Phase mobile – Solvant B : Eau + 0,05% TFA. Ajouter 800 mL d'eau Milli-Q et 500 µL de TFA grade HPLC dans une fiole jaugée de 1 L puis compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau Milli-Q. Transférer la solution dans une bouteille à éluant pour HPLC et dégazer avant utilisation. La solution doit être remplacée toutes les deux semaines;
- Débit de la phase mobile : entre 0,3 et 1,0 mL.min-1 en fonction de la colonne HPLC sélectionée;
- Détecteur : Longueur d'onde fixée à 238 nm. L'obtention d'un spectre entre 200 et 300 nm est recommandée pour confirmer l'identité des toxines.

La méthode HPLC-UV développée au niveau international (ISO 20179:2005) a été validée lors d'une étude comparative réalisée par 25 laboratoires représentants 9 pays à travers le monde. Les résultats de cette étude indiquent une bonne répétabilité de la méthode analytique avec des coefficients de répétabilité compris entre 9,1 et 9,3% pour MC-RR, entre 3,0 et 10,4% pour MC-YR et entre 3,0 et 10,0% pour MC-LR. Les coefficients de reproductibilité étaient pour leur part compris entre 17,5 et 40,1% pour MC-RR, entre 6,8 et 37,3% pour MC-YR et entre 15,0 et 36,0% pour MC-LR. Les taux de récupération réalisés sur différents types d'échantillons (eau de consommation, eau de rivière et eau usée) étaient estimés entre 77,0 et 91,3% pour MC-RR, entre 73,5 et 89,6% pour MC-YR et entre 76,6 et 89,4% pour MC-LR (ISO 20179:2005).

Au niveau Européen, le protocole opératoire standard établi par Meriluoto et Spoof (2005d) (SOP_TOXIC_AAU_06F) préconise les conditions suivantes pour la détection, l'identification et la quantification des microcystines:

- Pré-colonne HPLC : Une pré-colonne compatible avec la colonne C18 sélectionnée est requise pour protéger la colonne;
- Colonne HPLC : Colonne phase inverse C18 de type Purosher STAR RP-18 (55 x 4 mm, 3 µm endcapée, Merck) recommandée pour les échantillons simples ou Purosher STAR RP-18 (250 x 4 mm, 5 µm particules encappée, Merck) pour les matrices complexes;
- Volume injecté : 10 µL;
- Four : Température fixée à 40°C;
- Phase mobile – Solvant A : Eau + 0,05% TFA. Ajouter 800 µL de TFA grade HPLC dans 1,6 L d'eau. La solution doit être remplacée chaque semaine;
- Phase mobile – Solvant B : Acétonitrile grade HPLC + 0,05% TFA. Ajouter 400 µL de TFA grade HPLC dans 800 mL d'acétonitrile grade HPLC. La solution doit être remplacée chaque semaine;
- Débit de la phase mobile : 1 mL.min-1 pour colonne Purosher STAR RP-18 (55 x 4 mm, 3 µm endcapée, Merck) et 0,75 mL.min-1 pour colonne Purosher STAR RP-18 (250 x 4 mm, 5 µm particules encappée, Merck);
- Détecteur : Longueur d'onde fixée à 238 nm.

En Afrique du Sud, le protocole opératoire standard établi par Swanepoel et al. (2008) préconise les conditions suivantes pour la détection, l'identification et la quantification des microcystines:

- Pré-colonne HPLC : Une pré-colonne compatible avec la colonne C18 sélectionnée est requise pour protéger la colonne;
- Colonne HPLC : Colonne phase inverse C18 ou ODS-2 (250 x 4,6 mm, 3 – 5 µm particules);
- Four : Température fixée à 40°C;
- Phase mobile – Solvant A : Acétonitrile grade HPLC + TFA. Ajouter 800 mL d'acétonitrile grade HPLC dans une fiole jaugée de 1 L puis ajouter 500 µL de TFA et 10 mL d'eau ultra-pure, compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'acétonitrile. Dégazer et filtrer la solution avant utilisation. La solution est stable pendant trois semaines si cette dernière est conservée à température ambiante;

- Phase mobile – Solvant B : Eau ultra-pure + TFA. Ajouter 800 mL d'eau ultra-pure dans une fiole jaugée de 1 L puis ajouter 500 µL de TFA et 10 mL d'acétonitrile, compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau ultra-pure. Dégazer et filtrer la solution avant utilisation. La solution est stable pendant deux semaines si cette dernière est conservée à température ambiante;
- Débit de la phase mobile : ajuster le débit de la phase mobile entre 0,3 et 1,0 mL.min-1 en fonction de la longueur de la colonne de manière à obtenir une allure et une résolution optimales des pics;
- Détecteur : Longueur d'onde fixée à 238 nm. Acquérir les spectres d'adsorption entre 200 et 300 nm afin de confirmer l'identité des microcystines.

LC/MS

Au niveau Européen, le protocole opératoire standard établi par Sjövall et Meriluoto (2005) (SOP_TOXIC_AAU_10F) préconise les conditions suivantes pour la détection, l'identification et la quantification des microcystines:

- Pré-colonne HPLC : Une pré-colonne compatible avec la colonne C18 sélectionnée est requise pour protéger la colonne;
- Colonne HPLC : Colonne phase inverse C18 de type Purosher STAR RP-18 (30 x 4 mm, 3 µm endcapée, Merck) ou Purosher STAR RP-18 (55 x 4 mm, 3 µm endcapée, Merck) recommandée pour les échantillons simples ou Purosher STAR RP-18 (250 x 4 mm, 5 µm particules encappée, Merck) pour les matrices complexes;
- Volume injecté : 10 µL;
- Four : Température fixée à 40°C;
- Phase mobile – Solvant A : Eau + 0,5% TFA. La solution doit être remplacée chaque semaine;
- Phase mobile – Solvant B : Acétonitrile grade HPLC. La solution doit être remplacée chaque semaine;
- Débit de la phase mobile : 0,5 $mL.min^{-1}$ pour colonne de type Purosher STAR RP-18 (30 x 4 mm, 3 µm endcapée, Merck);
- Détecteur : Température de la source : 150°C; Température de désolvatation : 300 – 350°C.

De façon générale, les méthodes chromatographiques (HPLC-UV, HPLC-PDA ou LC/MS) sont très utilisées à travers le monde (Tableau 5.26) pour la détection, l'identification et la quantification des microcystines et des nodularines dans les échantillons d'eaux récréatives et/ou de consommation. Des colonnes en phase inverse de type C18 et des gradients de concentration des phases mobiles (eau : acétonitrile acidifiés au TFA, préférentiellement) sont utilisés pour permettre la séparation des microcystines et des nodularines. Le gradient de solvants utilisé doit couvrir une large gamme de polarité (acétonitrile entre 30 et 70%) pour favoriser l'analyse de l'ensemble des microcystines dont les polarités sont très variables (Chorus et al. 1999). D'autres phases mobiles telles que MeOH:eau ou Acétonitrile:acétate d'ammonium se sont avérées très efficaces pour séparer les différentes variantes de microcystines et de nodularines (Chorus et al. 1999). Plusieurs études font état de l'utilisation de ces méthodes chromatographiques pour le suivi des microcystines et nodularines dans des échantillons d'eau brute, et ce à travers le monde. Par exemple, lors de leur étude de caractérisation et de suivi des cyanotoxines dans le lac Albano (Italie), Bogialli et al. (2006) ont quantifié les microcytines et la cylindrospermosine par LC/MS/MS. Le système analytique utilisé était doté d'une pré-colonne C18 HP (7,5 x 4,6 mm, 5 µm taille de particules) suivie par une colonne Alltech (250 x 4,6 mm). La méthode d'analyse développée par ces auteurs permet d'obtenir des résultats fiables (ajouts dosés : récupération de 93%) et reproductibles (coefficients de variation < 8%). Selon Goel et Myers (2008), un suivi de la Baie de Farmington (GreatSalt Lake, Itah) a été réalisé pour quantifier les nodularines intra- et extra-cellulaires par UPLC/MS sur une colone Luna C18 (250 x 4,6 mm; 4 µm taille de particules, Phenomenex), éluées en présence d'une solution d'eau acidifiée avec 0,1% de TFA (Solvant A) et d'acétonitrile (Solvant B). La méthode d'analyse décrite par ces auteurs permet d'obtenir des résultats fiables (ajouts dosés : récupération de 99%) et une détection des nodularines à des concentrations aussi faibles que 0,05 $\mu g.L^{-1}$.

Tableau 5.26 Récapitulatif des conditions opératoires utilisées par les laboratoires contactés réalisant l'analyse des microcytines et/ou nodularines à l'aide de méthodes chromatographiques (d'après les réponses aux questionnaires)

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
Allemagne	2	HPLC-UV	Colonne Purosher Star RP-18 (55 x 4 mm, 3 µm particules, Merck)	Solvant A:eau acidifiée (0,05% TFA), Solvant B : Acétontrile acidifé (0,05% TFA)	n.c.*	n.c.	n.c.	n.c.	Willame et Hoffman (2005)
Argentine	3	HPLC/UV ou LC/MS	Colonne Polaris 5 µm C18-A (5 µm particules, Varian)	n.c.	Solution Standard Sigma-Aldrich	LD = 0,04 ppb, LQ = 0,12 ppb	1 semaine	160 US $	Ame et al. (2010)
Australie	7	HPLC/UV ou LC/MS/MS	Colonne C18	n.c.	Solution NRC Canada	LD = 0,5 ppb	30 min	105 - 150 AUD	n.c.
Australie	8	HPLC/PDA	n.c.	n.c.	n.c.	LD = 0,1 ppb pour MC-LR, MC-RR et MC-YR	n.c.	n.c.	Méthode interne accréditée NATA
Autriche	10	HPLC-PDA	n.c.	n.c.	CyanoBiotech GmbH	LD = 1,0 ppb	n.c.	50 €	Lawton et al. (1994)
Brésil	11	HPLC/PDA, LC/MS/MS	Colonne Kinetex C18 100A (50 x 2,1 mm, 2,6µm particules, Allcrom)	n.c.	Solution standard Abraxis	LD = 0,1 ppb, LQ = 0,5 ppb	28 h	179 R$	Spoof et al. (2003)
Canada	13	LC/MS/MS	Colonne C18 Kinetex (50 × 2,1 mm; 2,6 µm particules, Phenomenex)	Solvant A: MeOH acidifié (0,1% acide formique), Solvant B : Eau acidifée (0,1% acide formique)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Canada	16	LC/MS/MS	Colonne C18	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant Elution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
Canada	17	LC/MS/MS	Colonne phase inverse C18 BDS Hypersil	Acétone acidifié avec acide formique (0,1%)	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Canada	18	HPLC/UV, HPLC/PDA, LC/MS	Colonne phase inverse Agilent Poroshell Sb C18 (150 x 2,1mm, 2,7µm particules)	n.c.	CRMs	n.c.	n.c.	n.c.	Méthode interne non réalisée en routine pour le moment
Danemark	19	HPLC/PDA	Colonne C18, (250 x 4 mm)	n.c.	Microcystins standard DHI Lab Products	LD : 0,01 ppb LQ : 0,03 ppb	40 min par éch.	85 - 430 €	Méthode modifié de la norme ISO 20179:2005
Espagne	20	LC/MS ou LC/MS/MS	n.c.	n.c.	Alexis (Suisse), LGC Standards, Sigma-Aldrich	LD (E) = 0,0002-0,07 $mg.L^{-1}$; LD (I) = 0,02-0,4 ppb	2 j	100 - 500 €	n.c.
Espagne	21	HPLC/PDA, LC/MS	Colonne Ultracarb C-18	Solvant A: Eau acidifiée TFA (0,05%), Solvant B: Acétonotrile acidifié TFA (0,05%)	n.c.	n.c.	2 j	30 €	n.c.
Estonie	23	HPLC-PDA, LC/MS	Colonne Discovery RP Amide C16 (250 x 3 mm, 5µm particules)	Solvant A: Eau acidifiée à acide acétique (0,05%), Solvant B: Acétonitrile acidifié à acide acétique (0,05%)	Calbochiem	n.c.	n.c.	n.c.	Tanner et al. (2005)

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant Elution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
Finlande	24	HPLC/PDA	Waters XBridge C18 (150 x 3,0 mm, 3,5 µm particules)	n.c.	NOD-R and MC-LR : DHI Denmark et Åbo Akademi University	LD = 0,5 ng pour NOD-R et MC-LR	2,5 h	5 - 10 €	Méthode interne
France	26	LC/MS	Colonne C18	n.c.	n.c.	50 $ng.L^{-1}$	15 min		n.c.
France	27	LC/MS	Colonne Synergi 4µ Hydro-RP 80A (4µm particules, Phenomenex)	n.c.	COGER	LD: 0,2 ppb	48 h – 5 j	120 – 210 €	MCs: norme ISO 20179
France	28	LC/MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	1 à 7 j	n.c.	n.c.
France	29	LC/MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	24 – 48 h	350 €	n.c.
France	32	Injection directe LC/MSMS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	2 h	n.c.	Norme ISO 20179
France	34	HPLC/UV	Colonne Kinetex (100 x 4,6 mm, 2,6 µm particules, Phenomenex)	Solvant A: Acétonitrile, Solvant B: Acétate d'ammonium 0,01 M	n.c.	n.c.	30 min	n.c.	Méthode interne
France	35	LC/MS	Colonne de garde + Colonne phase inverse C18 Type Gemini (50 x 2mm, 3 µm particules, Phenomenex)	n.c.	Novakits	LD = ≈ $µg.g^{-1}$	48 h	n.c.	Neffling et al. (2O10)
France	36	HPLC-PDA	Colonne Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm particules)	Solvant A: Eau/TFA (0,3%), Solvant B: Acétonitrile/TFA (0,3%)	Sigma Aldrich	n.c.	n.c.	n.c.	Sotton et al. (2011)

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
France	37	LC/MS/MS	Colonne C18	n.c.	Novakits	LD = 0,3 - 1 ppb	48 h	220 €	Norme ISO 20179
Grèce	43	HPLC-UV, HPLC-PDA, LC/MS/MS	Colonne C18	n.c.	Sigma-Aldrich, Abraxis, Enzo Chemicals	LD = 0,002-0,005 ppb, LQ = 0,006 ppb	n.c.	n.c.	Norme ISO 20179
Grèce	44	HPLC	Colonne ThermoHypersil (ODS) C18	n.c.	n.c.	2 -10 ppb MC-LR	24 h	800 € pour 40 éch. .	n.c.
Hongrie	46	HPLC-UV	Colonne : C18 (250 x 2 - 4,6 mm, 3 - 5µm particules)	MeOH:eau H_3PO_4 (63:37:0,05, v/v/v)	n.c.	n.c.	2 j	200 €	n.c.
Israël	48	HPLC-PDA	Colonne C18 Luna (250 x 4,6 mm, 5 µm particules, Phenomenex)	n.c.	ENZO Life Sciences	n.c.	2 - 5 j	100 $	Méthode interne
Italie	49	HPLC/PDA, LC/MS	Colonne C18 (1,7 µm particules)	n.c.	Solution standard provenant de Sigma Aldrich	LQ: 0,02 – 0,10 ng par injection	10 min	n.c.	Méthode interne développée à partir de Codd et Meriluoto (2005)

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
Japon	50	LC/MS	Colonne Ascentis Express C-18 (Supelco)	n.c.	Kanto Chemicals et Wako Pure Chemicals	LD = 2 à 3 pg par injection	3 h	n.c.	Sano et al. (2013)
Luxembourg	52	LC/MS	Colonne Gravity C18 (Macherey Nagel)	n.c.	Enzo Life Sciences	LD = 1 - 10 ppb, LQ = 3 - 30 ppb	1 j	100 €	MCs: norme ISO 20179
Nouvelle-Zélande	56	LC/MS	Colonne C18	n.c.	n.c.	LD = 0,1 $ng.mL^{-1}$	6 min	n.c.	Méthode interne
Pays-Bas	61	HPLC-DAD (majoritairement), LC/MS	Colonne phase inverse 19	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Pays-Bas	62	LC/MS/MS	Colonne Agilent Eclipse XDB C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm particules)	Solvant A: Acide formique 0,1% dans eau, Solvant B : Acide formique 0,1% dans acétonitrile	DHI LAB Products	n.c.	2 - 3 j	150 €	Lurling et Faassen (2012)
Pologne	64	HPLC/UV	Pré-colonne: C18 (4 mm x 2 mm, Phenomenex , USA); Colonne: Nucleosil 100 5 C18 (250 mm x 2 mm, Phenomenex, USA)	n.c.	Enzo Life Sciences	LD = 0,2 ppb; LQ = 0,5 ppb	2 j	50 €	Jurczak et al. (2004)
Pologne	65	HPLC-PDA, LC/MS/MS	Colonne Luna 5u C18(5 µm particules, Phenomenex) ou Zorbax Eclipse XDB-C18, Analytical (150 x 4,6 mm, 5 µm particules)	n.c.	Alexis, Sigma Aldrich	LD = 0,3 – 1,5 $µg.cm^{-3}$	n.c.	25 € (HPLC) et 35 € (LC/MS)	Meriluoto et Codd (2005)

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
Portugal	66	HPLC/UV, HPLC/PDA, LC/MS	Colonne C18	n.c.	n.c.	LD = 0,1-0,3 µg.mL^{-1}, LQ = 0,3-0,5 µg.mL^{-1}	n.c.	20 - 100 €	Pinheiro et al. (2013)
République Tchèque	67	Routine: HPLC-PDA et LC/MS	n.c.	n.c.	n.c.	LD = 0,1 ppb (injection: 10 µL)	1 j	100 US $	Méthode interne
Slovaquie	69	HPLC/PDA	Colonne Sinergy Fusion RP, (75 x 2 mm, 4 µm particules) ou Inertsil 5, C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm particules, Varian)	n.c.	Enzo Life Sciences et Alexis Biochemical	LD = 0,074 - 0,083 ppb, LQ = 0,1 ppb	3 h	100 – 150 €	Bláhová et al. (2009)
Slovénie	70	HPLC-PDA, LC/MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	2 j	n.c.	Metcalf et Codd (2005), Norme ISO 20179:2005
Sri Lanka	71	HPLC-PDA (moins utilisé)	Colonne C18	Solvant A: Eau acidifiée 0,05% TFA et Solvant B: Acétonitrile acidifié 0,05% TFA	Sigma Aldrich	n.c.	2 - 3 j	56$	Lawton et al. (1994)
Suisse	73	HPLC-UV, HPLC-PDA, LC/MS	Colonne C18	n.c.	n.c.	LD = 0,1 µM	n.c.	n.c.	Méthode interne
Suisse	74	LC/MS/MS	Colonne Phenomenex Luna C18 (100 x 2 mm, 3 µm particules)	n.c.	Sigma Aldrich	LQ (E) = 10 - 25 ng.L^{-1}, LQ (I) = 20 - 50 ng.L^{-1}	1h15 par éch.	270 - 320 CHF	Méthode interne
Taïwan	75	LC/MS/MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
Turquie	77	HPLC-PDA	Colonne C18 (150 x 3,9 mm, 5 µm particules)	n.c.	n.c.	n.c.	1 j	n.c.	n.c.
USA	79	LC/MS/MS	Waters x-Bridge Phenyl (150 x 2,1 mm, 3,5µm particules)	n.c.	Solution standard Enzolife Science	LD = 0,5 ppb, LQ = 1,0ppb	30 min	500 US $	Méthode développée suivant Florida DEP SOP et Applied Biosystems
USA	80	LC/MS	Colonne Kinetex (50 x 2,1 mm, 2,6 µm particules)	n.c.	Solutions standards Abraxis ou BioTrend	LD = 0,1 ppb, LQ = 0,5 ppb	30 min	300 NZD	Méthode adaptée de Takino et Kyono (2002)
USA	82	LC/MS/MS pour con-firmation	n.c.	n.c.	NRC, Sigma Aldrich, Enzo, Marbionc	LD = 0,15 µg/L	24 - 72 h	100 - 400$ par analyte	n.c.
USA	83	LC/MS	Colonne C18 T3 (100 x 2,1 mm, 3 µm particules, Waters)	n.c.	Sigma Aldrich	LD = 0,16 ppb	2 j	350 $	Méthode interne
USA	84	LC/MS/MS	Colonne dC18 (150 x 3 mm, 3 µm particules, Waters Atlantis) et pré-colonne (20 x 3,9 mm, 3 µm particules, Waters Atlantis)	n.c.	MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LW, MC-RR: Calbiochem; MC-YR: Sigma Aldrich; MC-LY, NOD: Abraxis	LD = 0,02 ppb	n.c.	n.c.	n.c.

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
USA	85	LC/MS/MS	Colonne Waters YMC ODS-AQ (150 x 2,0 mm, 5 µm particules, Waters)	Solvant A: Acide formique 0,1% dans eau, Solvant B: Acide formique 0,1% dans acétonitrile	Solution standards Alexis Biomedicals	LD = 0,05 - 0,29 ppb, LQ = 0,16 - 0,87 ppb	24 h	350 US$	Méthode interne
USA	86	HPLC-UV, HPLC-PDA, LC-MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Méthode en cours de développe ment
USA	87	LC/MS/MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Méthode en cours de développe ment
USA	88	UPLC/MS	Colonne Acquity UPLC HSS-T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm particules)	Solvant A: Eau acidifiée 0,05% TFA, Solvant B: Acétonitrile acidifié 0,05% TFA	Sigma Aldrich	n.c.	n.c.	n.c.	Méthode interne
USA	89	HPLC-PDA pour con-firmation	n.c.	n.c.	n.c.	LD = 0,1 ppb	2 h	n.c.	n.c.
USA	90	HPLC-PDA	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	80 – 110 $	n.c.
USA	93	LC/MS	Colonne C18 (50 x20 mm,3 µm particules, Metachem) ou Symmery C8 (100 x 21 mm, 3,5 µm particules,Waters)	Solvant A Acétonitrile acidifié au HFBA 0,02%, Solvant B: Eau acidifiée au HFBA (0,02%) ou Solvant A: Acétonitrile acidifié au TFA (0,05%), Solvant B: Eau acidifiée au TFA (0,05%)	n.c.	LD = 0,5 ppb	n.c.	n.c.	n.c.

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
USA	94	LC-(ESI)MS/MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Méthode E3450
USA	95	UPLC/MS	Colonne Luna C18 (250 x 4,6 mm, 4 µm particules, Phenomenex)	Solvant A : Eau acidifiée au TFA (0,1%), Solvant B: Acétonitrile	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Goel et Myers (2009)

**n.c. : non communiqué.*

5.3.4.6 Saxitoxines

À ce jour, il n'existe aucun protocole d'opération standard International (norme ISO) ou Européen pour la détection, l'identification et la quantification des saxitoxines. Les méthodes permettant l'analyse des saxitoxines sont continuellement en évolution, elles font majoritairement appel à une détection par fluorescence ou spectrométrie de masse. Une des méthodes les plus utilisées au cours de ces dernières années a été développée par Oshima et al. (1995), basée sur une détection par fluorescence des saxitoxines par HPLC après oxydation post-colonne (Chorus et al. 1999). Cependant, cette méthode requière l'utilisation de trois phases mobiles pour permettre la séparation des différentes variantes de saxitoxines, rendant l'analyse plus complexe en termes de gestion et d'automatisation.

Une méthode officielle de l'AOAC International permettant la détection, l'identification et la quantification des saxitoxines présentes dans les échantillons marins et plus particulièrement dans les fruits de mer a été validée au cours d'une comparaison inter-laboratoires par Lawrence et al. (2005). Des études ont montré que cette méthode, applicable échantillons d'eaux récréatives et de consommation, ainsi qu'à la biomasse algale, génère des résultats fiables et reproductibles (Chorus et al. 1999). Cette méthode préconise les conditions opératoires suivantes pour une bonne résolution et séparation des pics :

- Colonne HPLC : Colonne phase inverse C18 de type Supelcosil LC-18 (15 x 4,6 mm, 5 µm taille de particules, Supelco) ou tout autre colonne ayant des spécifications similaires;
- Phase mobile – Solvant A : Eau + Formate d'ammonium à 0,1 M puis ajustement du pH de la solution à 6 par addition de 6 mL d'acide acétique 0,1 M;
- Phase mobile – Solvant B : Acétonitrile grade HPLC (5%) + Formate d'ammonium à 0,1 M puis ajustement du pH de la solution à 6 par addition de 6 mL d'acide acétique 0,1 M;
- Débit de la phase mobile : 2 $mL.min^{-1}$. Un ajustement du débit de la phase mobile est recommandé si les dimensions de la colonne ne sont pas identiques à celles spécifiées ci-dessus;
- Détecteur : Fluorescence – Longueur d'onde d'excitation fixée à 340 nm et d'émission fixée à 395 nm.

Les résultats obtenus lors de l'étude inter-laboratoires conduite par Lawrence et al. (2005) ayant permis la validation de cette méthode décrite plus haut sont présentés au Tableau 5.27. Bien que cette méthode d'analyse soit robuste et fiable pour l'analyse des saxitoxines, la préparation des échantillons

s’avère complexe, notamment les étapes d’oxydation requises pour la quantification de l’ensemble des variantes de saxitoxines. Selon Lawton et Edwards (2001), il est important de noter que les produits d’oxydation formés sont peu stables dans le temps, nécessitant de réaliser l’analyse par HPLC-Fluorescence rapidement.

Tableau 5.27 Reproductibilité (coefficient de variation exprimé en %) et taux de récupération (en %) des analyses de saxitoxines obtenus pour des échantillons de fruits de mer lors d’une étude inter-laboratoires pour valider la méthode AOAC 2005.06 (Lawrence et al. 2005)

	LC/Fluorescence après purification sur cartouche SPE C18		**LC/Fluorescence après purification sur cartouche SPE COOH**	
Saxitoxines	**Reproductibilité (CV en %)**	**Justesse (Récupération en %)**	**Reproductibilité (CV en %)**	**Justesse (Récupération en %)**
Saxitoxine	8 - 33	74,4 - 93,2	12 - 42	63,7 - 79,2
Néosaxitoxine	20 - 48	55,7 - 56,9	23 - 48	53,1 - 61,6
dc-Saxitoxine	10 - 49	64,3 - 83,7	19 - 58	66,0 - 69,0
GTX-1,4	19 - 85	60	18 - 39	66,9 - 78,5
GTX-2,3	15 - 32	75,8 - 88,2	16 - 29	85,4 - 93,9
B-1	10 - 33	77,8 - 86,4	9 - 29	66,5 - 77,5
C-1,2	14 - 105	73,5 - 78,3	15 - 38	84,4 - 86,0
C-3,4	21 - 48	n.c.	n.c.	n.c.

De nos jours, il semble que la méthode la plus utilisée par les laboratoires d’analyse à travers le monde fasse appel à une détection par spectrométrie de masse (LC/MS ou LC/MS/MS). En effet, parmi les 18 laboratoires réalisant une détection des saxitoxines à l’aide de méthodes chromatographiques, 12 laboratoires utilisent une détection par spectrométrie de masse alors que seulement 6 laboratoires utilisent la détection par fluorescence des saxitoxines après oxydation de certaines variantes. La détection des saxitoxines par spectrométrie de masse peut cependant poser des difficultés techniques lors de la désolvatation des échantillons (Afssa et Afsset, 2006).

Tableau 5.28 Récapitulatif des conditions opératoires utilisées par les laboratoires contactés réalisant l'analyse des saxitoxines à l'aide de méthodes chromatographiques (d'après les réponses aux questionnaires)

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût par éch.	Méthode référence
Australie	7	HPLC/Fluorescence	Colonne C18	n.c.*	Solution NRC Canada	LD = 2 ppb	< 30 min	105 - 150 AUD	n.c.
Australie	8	HPLC/Fluorescence avec dérivation post-colonne	n.c.	n.c.	n.c.	LD = 0,5 ppb	n.c.	n.c.	Méthode interne accréditée NATA
Brésil	11	LC/MS/MS	Colonne LiChrospher 100RP 18 (125 x 4 mm, 5µm particules, Merck)	n.c.	Solution standard NRC (Canada)	LD = 1,0 ppb, LQ = 6,0 ppb	59 h	140R$	Oshima (1995)
Canada	18	HILIC/MS/MS	Colonne TosoHaas Amide 80, (150 x 2,1 mm, 3µm particules)	n.c.	CRMS	n.c.	n.c.	n.c.	Méthode interne non réalisée en routine pour le moment.
Espagne	20	LC/MS ou LC/MS/MS	n.c.	n.c.	Alexis (Suisse), LGC Standards, Sigma-Aldrich, Cyano Biotech GmbH	LD (E) = 0,07 ppb; LD (I) = 0,4ppb	2 j	100 – 500 €	n.c.
Espagne	21	LC/MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	2 j	30 €	n.c.
Finlande	24	HPLC/ECOS/FLD pour STX, GTX2 et GTX3	Waters XBridge C18 (150 x 3,0 mm, 3,5 µm particules)	n.c.	STX, GTX2, GTX3 : NRC Canada	0,06 – 0,12 µM	2,5 h	5-10 €	Méthode interne
France	27	UHPLC/MS/MS	Colonne Acquity UPLC BEH C18 (Waters)	n.c.	LGC Standard	2 ppb	48 h – 5 j	120 €	Méthode interne

Pays	Code Laboratoire	Analyse	Type de colonne	Solvant élution	Solution standard	LD/LQ	Temps	Coût	Méthode référence
France	29	HPLC/MS	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Méthode AOAC 959.08
France	37	LC/MS/MS	Colonne: HILIC	n.c.	Novakits	LD = 0,3 - 1 ppb	48 h	220 €	n.c.
Japon	50	LC/MS	Colonne ODS	n.c.	Fournies par le gouvernement	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Pays-Bas	61	LC/MS/MS	Colonne ZIC-HILIC (150 x 2,1 mm, 5 µm particules)	n.c.	n.c.	LD = 14 - 600 fmol par injection, LQ = 14 - 1000 fmol par injection	2-3 j	175 €	Méthode toujours en développement
Pologne	65	LC/MS/MS	Colonne Luna 5u C18(5µm particules, Phenomenex)	n.c.	Alexis, Sigma Aldrich	LD = 1,5 $ng.cm^{-3}$	n.c.	35 €	n.c.
USA	82	LC/Fluorescence	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	Méthode AOAC 2005.06
USA	84	LC/MS/MS	Colonne dC18 (150 x 3 mm, 3 µm particules, Waters Atlantis)	n.c.	n.c.	LD = 0,02 ppb	n.c.	n.c.	n.c.
USA	85	LC/MS/MS	Colonne Waters YMC ODS-AQ (150 x 2,0 mm, 5 µm particules)	n.c.	n.c.	LD = 0,05 - 0,29 ppb; LQ = 0,16 - 0,87 ppb	24 h	350 US$	n.c.
USA	89	HPLC après dérivation fluorescence	n.c.	n.c.	n.c.	LD = 0,1 ppb	2 h	n.c.	n.c.
USA	93	HPLC/FL	n.c.	n.c.	n.c.	LD = 10 $ng.L^{-1}$	n.c.	n.c.	Oshima (1995)

**n.c. : non communiqué.*

5.3.5 Comparaison des méthodes de détection et de quantification des cyanotoxines

De nos jours, il existe une gamme très étendue de méthodes analytiques utilisées dans les laboratoires pour détecter, identifier et quantifier les cyanotoxines en situation d'efflorescence. Afin d'assurer une gestion adéquate des plans d'eau ou des stations de traitement d'eau potable, il est important de s'assurer de sélectionner la méthode d'analyse répondant le mieux à la problématique et/ou aux besoins (nécessité de déterminer la toxicité de l'échantillon, la présence d'une toxine en particulier, etc.). Par exemple, dans le cas où une estimation de la toxicité d'un échantillon est requise, les méthodes immunologiques ou enzymatiques semblent être plus adéquates alors que dans le cas où une identification précise des toxines est requise, les techniques chromatographiques s'avèrent être les plus appropriées étant donné qu'elles sont les seules méthodes développées à ce jour permettant d'identifier avec certitude les toxines. Chaque méthode d'analyse, qu'elle soit immunologique, enzymatique ou chromatographique possède certains avantages et inconvénients. Comme l'indique le Tableau 5.29, les différentes méthodes possèdent des niveaux de détection très variables, allant de 1 à 200 µg pour les bio-essais sur souris, de 0,1 à 3 $\mu g.L^{-1}$ pour les tests enzymatiques PPIA, de 0,015 à 10 $\mu g.L^{-1}$ pour les tests immunologiques ELISA, et de 0,002 à 10 $\mu g.L^{-1}$ pour les méthodes chromatographiques. Selon une étude réalisée par Morrall et al. (2001), il est très important de sélectionner la méthode d'analyse en fonction de la concentration en cyanotoxines estimée. En effet, une plus grande incertitude de mesure sera observée pour la détermination d'une très faible concentration à l'aide d'une méthode analytique possédant une limite de détection assez élevée comparativement à une détermination à l'aide d'une méthode analytique avec une limite de détection très basse.

De manière générale, les bio-essais sur souris permettent une mesure simple et directe de la toxicité totale d'un échantillon d'eau brute donné. Dans le cas où une estimation du risque sanitaire d'un échantillon d'eau brute est souhaitée, les bio-essais sur souris semblent être les plus adaptés car les méthodes enzymatiques, immunologiques et chromatographiques ne permettent pas toujours de relier la présence de cyanotoxines à la toxicité globale de l'échantillon. Cependant, les bio-essais sur souris s'avèrent être non sélectifs (la toxine ayant la plus grande toxicité masquera la présence d'autres toxines), peu éthiques (utilisation d'animaux vivants) et peu sensibles (limite de détection élevée). De nos jours, les bio-essais sur souris sont peu utilisés par les laboratoires d'analyse à travers le monde, excepté pour la détection de saxitoxines dans les échantillons marins ou les fruits de mer.

Les tests immunologiques de type ELISA et les tests enzymatiques de type PPIA sont plus couramment utilisés pour une détection rapide de la présence de cyanotoxines (quelques heures) et dans certains cas, pour évaluer la toxicité d'un échantillon (méthode enzymatique). Les kits commerciaux actuellement disponibles permettent une analyse qualitative, semi-quantitative ou quantitative pour différents types de cyanotoxines (anatoxine-a, BMAA, cylindrospermopsine, microcystines, nodularines, saxitoxines). Certains kits commerciaux ont été validés par l'USEPA après une étude complète de leur performance (justesse, précision, répétablitié, reproductibilité). De manière générale, les méthodes enzymatiques et immunologiques sont relativement fiables, s'avèrent peu coûteuses (Figure 5.8) et ne requièrent pas de matériels spécifiques ni de main d'œuvre entaînée ou spécialisée. Cependant, ces méthodes colorimétriques ne permettent pas d'identifier les différentes variantes de toxines d'un échantillon d'eau donné et des faux-positifs ou faux-négatifs. Ces méthodes d'analyse représentent d'excellents outils de détection qui permettent d'identifier rapidement la présence de cyanotoxines et ainsi de réduire le nombre d'échantillons nécessitant une analyse chromatographique plus poussée, plus complexe et plus exigeante en temps pour identifier et quantifier avec certitude la ou les toxine(s) présente(s).

Les méthodes chromatographiques (HPLC-UV, HPLC-PDA, LC-MS ou LC-MS-MS) sont les techniques les plus couramment utilisées de nos jours par les laboratoires d'analyse. En effet, ces techniques permettent à la fois de détecter, d'identifier et de quantifier avec justesse et précision les différents types et variantes de cyanotoxines. Ces méthodes permettent une identification des cyanotoxines en se basant sur les temps de rétention et les spectres UV (HPLC-UV ou HPLC-PDA) ou sur les temps de rétention et le ratio masse/charge (LC-MS, LC/MS/MS) en comparaison avec des solutions standards certifiées. Cependant, ces méthodes sont très coûteuses (Figure 5.8) (appareillages entre 50 et 150 K$) et très exigeantes en temps, puisqu'elles nécessitent souvent des étapes de concentration et de purification complexes pouvant entraîner des imprécisions. La complexité des étapes de préparation et d'utilisation de ces appareils analytiques de pointe (HPLC-UV, HPLC-PDA, LC-MS); comparativement aux méthodes immunologiques ou enzymatiques nécessite de former du personnel hautement qualifié. De plus, le manque de solutions standards certifiées pour l'ensemble des variantes de cyanotoxines rend difficile l'identification de certaines variantes de toxines notamment lors de l'utilisation de détecteurs UV, et entraîne un risque de surestimation des teneurs en cyanotoxines pour les échantillons peu concentrés. Les spectromètres de masse permettent d'identifier les variantes de toxines pour lesquelles aucune solution standard n'est actuellement disponible sur le marché mais les équipements nécessaires s'avèrent encore plus coûteux que les détecteurs UV et plus complexes à utiliser. De manière générale,

les méthodes chromatographiques permettent une identification et une quantification précise des toxines, et ainsi une gestion adéquate des eaux récréatives ou de consommation. Cependant, les délais importants liés aux étapes de préparation des échantillons (lyse cellulaire, concentration, purification) représentent un inconvénient non négligeable pour une bonne gestion des plans d'eau ou des stations de potabilisation de l'eau.

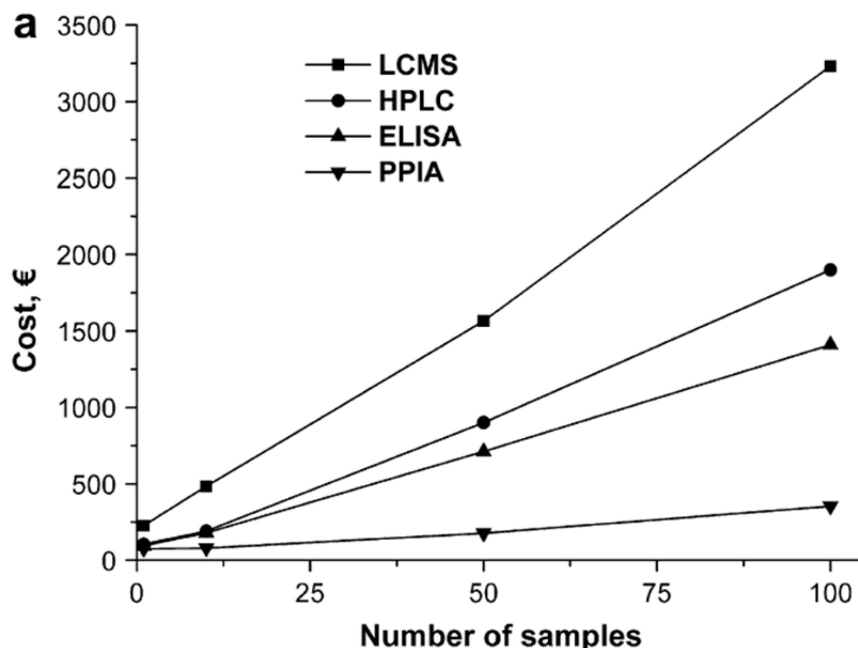


Figure 5.8 **Estimation des coûts d'analyse pour la détection, l'identification et la quantification des cyanotoxines en fonction des techniques analytiques utilisées (PPIA, ELISA, HPLC-UV, LC-MS) et du nombre d'échantillons (Triantis et al. 2010)**

Certaines études comparatives ont mis en évidence l'obtention de résultats plus ou moins similaires pour un même échantillon analysé avec différentes méthodes analytiques (méthodes immunologiques, enzymatiques et chromatographiques) (Aranda-Rodriguez et Jin 2011; Costa et al. 2009; Morrall et al. 2001; Rapala et al. 2002v; Törökné et al. 2004). Selon Morrall et al. (2001), les différences de concentrations observées sont partiellement dues au fait que ces différentes techniques analytiques sont basées sur la mesure de propriétés différentes des toxines. En effet, les méthodes chromatographiques HPLC-UV et HPLC-PDA sont basées sur la mesure de l'absorance UV des toxines alors que les tests immunologiques sont basés sur l'inhibition d'une protéine, et les bio-essais sur la

toxicité globale de l'échantillon. Il arrive parfois que pour un même échantillon d'eau, une forte concentration en toxines soit mesurée par HPLC alors qu'en réalité cet échantillon est peu toxique (Morrall et al. 2001). Ces résultats mettent en évidence la nécessité de coupler différentes méthodes analytiques afin d'obtenir une vue d'ensemble et de pouvoir prendre les bonnes décisions de gestion des plans d'eau. Cependant, le couplage de méthodes anlaytiques entraîne une augmentation importante des coûts d'analyse, un compromis doit donc être trouvé.

Tableau 5.29 Récapitulatif des méthodes analytiques disponibles à ce jour pour la détection, l'identification et/ou la quantification des cyanotoxines (Nicholson et Burch 2001; USGS 2008)

Méthode analytique	Toxine analysée	Limite de détection	Avantages	Inconvénients
Bioessai sur souris	ATX-a, BMAA, CYL, MCs, NODs, STX	1 - 200 µg	Mesure directe de la toxicité totale de l'échantillon; Simple	Non sélectif; Peu éthique; Peu sensible; Nécessite de l'espace
PPIA	ATX-a, MCs	0,1 – 3 $\mu g.L^{-1}$	Mesure directe de la toxicité de l'échantillon; Peu d'expertise requise; Peu coûteux	Pas d'identification des toxines présentes; Interférences possibles avec d'autres molécules; Peu sensible pour certaines toxines ou variantes
ELISA	ATX-a, BMAA, CYL, MCs, NODs, STX	0,015 - 10 $\mu g.L^{-1}$ selon les toxines	Peu d'expertise requise; Spécfique pour chaque toxine; Excellent outil de détection	Faux négatifs; Faux positifs; Sous-estimation possible; Variantes non toxiques détectées
HPLC-UV ou HPLC-PDA	ATX-a, CYL, MCs, NODs, STX	0,015 - 10 $\mu g.L^{-1}$ pour HPLC-UV; 0,07 - 0,6 $\mu g.L^{-1}$ pour HPLC-PDA	Bonne sensibilité et spécificité; Bonne reproductibilité; Résultats fiables; Identification et quantification des toxines possibles	Préparation des échantillons parfois complexe ou longue; Équipements coûteux; Main d'œuvre expérimentée requise; Sur-estimation possible; Identification de certaines variantes difficile voire impossible; Délai d'analyse parfois long
LC-MS ou LC/MS/MS	ATX-a, BMAA, CYL, MCs, NODs, STX	0,005 – 2 $\mu g.L^{-1}$	Très bonne sensibilité et spécificité; Très bonne reproductibilité; Résultats très fiables; Identification et quantification possible	Préparation des échantillons parfois complexe ou longue; Équipements très coûteux; Expert requis; Délai d'analyse parfois long

5.4 Expression des résultats

Plusieurs modes d'expression des résultats ont été proposés : µg de toxine par g de biomasse sèche, µg de toxine par g de chlorohpylle-a et plus récemment µg de toxine par L d'échantillon d'eau. De façon générale, les laboratoires expriment les concentrations de toxines en µg de toxine.L^{-1} ou en parties par billion (ppb) de manière à comparer plus facilement les résultats obtenus avec les recommandations de l'OMS ou du pays considéré.

5.4.1 Bio-essais sur souris

Les résultats de toxicité sont exprimés sous la forme de DL_{50}, en mg de cellule sèche par kg de souris. La toxicité est ensuite évaluée en se basant sur les critères suivants :

- > 1 000 : non toxique;
- 500 < x < 1 000 : toxicité faible;
- 100 < x < 500 : toxicité moyenne;
- < 100 : toxicité élevée.

Pour les saxitoxines, les résultats sont exprimés en µg.100 g^{-1} (de fruit de mer ou de biomasse algale). Pour cela, il faut déterminer le temps moyen écoulé entre l'injection et le décès des souris, incluant les survivants (> 60 min ou équivalent en « *unité souris* » à < 0,875). Ce temps moyen permet ensuite d'établir le facteur unité souris en se référant au Tableau de Sommer (Tableau 5.30). Si le poids des souris est inférieur à 19 ou supérieur à 21 g, il faut appliquer un facteur de correction en multipliant le facteur unité souris par le facteur de correction du poids des souris (Tableau 5.31) (AOAC 959.08, 2010). Il faut ensuite convertir l' unité souris en µg.L^{-1} en multipliant par le facteur de conversion (CF). La teneur en µg.100 g^{-1} (de fruit de mer ou de biomasse algale) est ensuite déterminée selon l'Équation 5.1 (AOAC 959.08, 2010):

Équation 5.1 $\mathbf{C = c \times f \times 200}$

Où :

C représente la teneur (fruit de mer ou biomasse algale), exprimée en µg.100g^{-1};

c représente la teneur calculée précédemment, exprimée en µg.L^{-1};

f représente le facteur de dilution.

Tableau 5.30 Relation entre le facteur « unité souris » et le temps écoulé entre l'injection et la mort pour les saxitoxines et les *Paralytic Shellfish Poison* (d'après AOAC 959.08 (2010))

Temps avant la mort (min:sec)	Unité souris	Temps avant la mort (min:sec)	Unité souris	Temps avant la mort (min:sec)	Unité souris	Temps avant la mort (min:sec)	Unité souris
01:00	100	03:05	3,57	05:05	1,89	11:00	1,075
01:10	66,2	03:10	3,43	05:10	1,86	11:30	1,06
01:15	38,3	03:15	3,31	05:15	1,83	12:00	1,05
01:20	26,4	03:20	3,19	05:20	1,80	12:13	1,03
01:25	20,7	03:25	3,08	05:30	1,74	12:14	1,015
01:30	16,5	03:30	2,98	05:40	1,69	12:15	1,000
01:35	13,9	03:35	2,88	05:45	1,67	12:16	0,99
01:40	11,9	03:40	2,79	05:50	1,64	12:17	0,98
01:45	10,4	03:45	2,71	06:00	1,60	12:18	0,972
01:50	9,33	03:50	2,63	06:15	1,54	12:19	0,965
01:55	8,42	03:55	2,56	06:30	1,48	12:20	0,96
02:00	7,67	04:00	2,5	06:45	1,43	12:21	0,954
02:05	7,04	04:05	2,44	07:00	1,39	12:22	0,948
02:10	6,52	04:10	2,38	07:15	1,35	12:23	0,942
02:15	6,06	04:15	2,32	07:30	1,31	12:24	0,937
02:20	5,66	04:20	2,26	07:45	1,28	12:25	0,934
02:25	5,32	04:25	2,21	08:00	1,25	12:30	0,917
02:30	5,00	04:30	2,16	08:15	1,22	12:40	0,898
02:35	4,73	04:35	2,12	08:30	1,20	13:00	0,875
02:40	4,48	04:40	2,08	08:45	1,18		
02:45	4,26	04:45	2,04	09:00	1,16		
02:50	4,06	04:50	2,00	09:30	1,13		
02:55	3,88	04:55	1,96	10:00	1,11		
03:00	3,70	05:00	1,92	10:30	1,09		

Tableau 5.31 Table de correction en fonction du poids des souris (d'après AOAC 959.08 (2010))

Poids de la souris (g)	Unité souris	Poids de la souris (g)	Unité souris
10	0,50	17	0,88
10,5	0,53	17,5	0,905
11	0,56	18	0,93
11,5	0,59	18,5	0,95
12	0,62	19	0,97
12,5	0,62	19,5	0,985
13	0,675	20	1,000
13,5	0,70	20,5	1,015
14	0,73	21	1,03
14,5	0,76	21,5	1,04
15	0,7885	22	1,05
15,5	0,81	22,5	1,06
16	0,84	23	1,07
16,5	0,86		

5.4.2 Tests enzymatiques (PPIA) ou immunologiques (ELISA)

Afin de quantifier les cyanotoxines d' un échantillon d'eau donné à l'aide de méthodes enzymatiques ou immunologiques, des solutions standards de concentrations connues sont préparées puis analysées dans les mêmes conditions que les échantillons, et ce pour chaque série d'analyse. La concentration en toxines des solutions standards ou des échantillons est déterminée par la mesure de la coloration que prend la solution, cette dernière étant inversement proportionnelle à la concentration en toxines. De manière générale, l'absorbance de chaque échantillon mesurée à l'aide du spectrophotomètre est déterminée à partir de la courbe de calibration établie grâce aux solutions standards. De manière générale, les courbes de calibration obtenues peuvent être de forme linéaire ou exponentielle. La concentration en toxines est généralement exprimée en $\mu g.L^{-1}$ afin de permettre une comparaison rapide avec les concentrations seuils établies par l'OMS ou le pays considéré. Dans le cas des microcystines, les résultats sont souvent exprimés en $\mu g.L^{-1}$ équivalent MC-LR. Afin d'établir les concentrations en microcystines en équivalent MC-LR, il est important de tenir compte des réactivités croisées déterminées par les fournisseurs des kits PP2A ou ELISA.

Dans le cas où la concentration mesurée est inférieure à la limite de détection, les résultats doivent être reportés de la manière suivante : < LD $\mu g.L^{-1}$. Dans le cas où la concentration en toxines mesurée est

supérieure à la concentration du standard le plus élevé, une dilution de l'échantillon doit être réalisée afin que la concentration soit comprise dans la courbe de calibration. Les concentrations en toxines sont généralement déterminées en duplicats ou en triplicats et la valeur moyenne ainsi que le coefficient de variation sont calculés. Les résultats obtenus sont validés si le coefficient de variation calculé est inférieur à une valeur limite définie par les laboratoires d'analyse (20 à 30% en général). Dans le cas contraire, il est recommandé de réaliser de nouveau les analyses.

5.4.3 Méthodes chromatographiques (HPLC)

Dans le cas d'une analyse par HPLC-UV, l'identification du pic correspondant à une toxine donnée se fait par comparaison du temps de rétention et du spectre UV à ceux des solutions standards analysées dans la même série d'analyse. Dans le cas d'une analyse par LC-MS, l'identification du pic correspondant à une toxine donné se fait par comparaison du temps de rétention et du ratio masse/charge à ceux pour des solutions standards analysée dans la même série d'analyse.

Une fois l'identité de la toxine confirmée, la concentration en toxines dans un échantillon d'eau est calculée selon l'Équation 5.2 (ISO 20179:2005).

Équation 5.2 $$[Toxine] = \frac{(y - b) \times Vd}{a \times Vsam}$$

Où :

- y représente la réponse donnée par le logiciel de l'appareil (droite de calibration : y = a x + b);
- b représente l'ordonnée à l'origine de la droite de calibration;
- a représente la pente de la droite de calibration ;
- V_d représente le volume de l'échantillon re-dissous après l'étape de purification sur cartouche SPE, exprimé en mL ;
- V_{samp} représente le volume d'échantillon appliqué sur la cartouche de purification SPE, exprimé en L.

La concentration de la toxine présente dans la biomasse algale est exprimée pour sa part selon l'Équation 5.3 (ISO 20179:2005).

Équation 5.3 $$[Toxine]= \frac{(y - b) \times f \times Vex}{a \times Vsam}$$

Où :

y	représente la réponse donnée par le logiciel de l'appareil (droite de calibration : y = a x + b);
b	représente l'ordonnée à l'origine de la droite de calibration;
a	représente la pente de la droite de calibration ;
f	représente le facteur de dilution lors de l'étape de lyse cellulaire ;
V_{ex}	représente le volume d'extraction, exprimé en mL ;
V_{samp}	représente le volume d'échantillon filtré, exprimé en mL.

5.5 Validation/Contrôle des résultats

Afin d'assurer une gestion efficace et sécuritaire des eaux récréatives et de consommation, il est important que les laboratoires d'analyse puissent certifier les résultats obtenus concernant la détection, l'identification et la quantification des cyanotoxines. Plusieurs moyens de vérification et de certification des résultats ont été développés. Le Tableau 5.32 présente les différents moyens de contrôle utilisés par les laboratoires à travers le monde afin de certifier l'exactitude des résultats obtenus.

Tableau 5.32 Récapitulatif des moyens de contrôle d'assurance qualité utilisés par les laboratoires analysant les cyanotoxines à travers le monde (d'après les réponses aux questionnaires)

Pays	Code Laboratoire	Toxines analysées	Moyens de contrôle assurance qualité
Afrique du Sud	1	MCs	Calibration de l'appareil avec des standards certifiés (R2 > 0,96) - Analyse des échantillons en duplicats et validation des résultats si le coefficient de variation est < 20% - Accréditation SANAS du laboratoire - Participation à des essais inter-laboratoires une fois par an (organisé par un laboratoire espagnol) - Réalisation d'essais inter-analystes deux fois par an
Allemagne	2	MC-LR, MC-RR et MC-YR	n.c.*
Argentine	3	MC-LR, MC-RR, MR-YR, MC-LA, Nodularine, Anatoxine-a	Analyse d'ajouts dosés - Calibration de l'appareil avec des standards certifiés
Australie	7	MCs, Anatoxine-a, Cylindrospermopsine, Deoxycylindrospermopsine, Saxitoxines	Calibration des appareils avec des solutions standards certifiées - Analyse de blancs, de solutions standards internes pour le contrôle de l'assurance qualité et de solution contrôle
Australie	8	MCs, Nodularines, Anatoxine-a, Saxitoxines, Cylindrospermopsine	Accréditation NATA du laboratoire
Autriche	10	MC-LR, MC-RR, MC-YR	Calibration de l'appareil à l'aide de solutions standards externes avant chaque série d'analyse (MC-LR, RR, YR).
Brésil	11	MCs, Saxitoxines, Cylindrospermopsine	Validation des appareils et des méthodes d'analyse - Calibration de l'appareil avec des solutions standard certifiées (R2 > 0,98) et des matériaux de référence certifié (NRC) à chaque série d'analyse - Analyse d'ajouts dosés (récupération entre 85 et 115%)
Bulgarie	12	MCs, Saxitoxines	n.c.
Canada	13	MC-HilR, MC-HtyR, MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LR(D-Asp3), MC-LW, MC-LY, MC-RR, MC-RR (D-Aps3), MC-WR, MC-YR	n.c.
Canada	16	MC-LR, MC-RR, MC-YR, Anatoxine-a	n.c.
Canada	17	MC-LR,MC-LA, MC-LY,MC-LW,MC-RR, Anatoxine-a, BMAA	n.c.

Pays	Code Laboratoire	Toxines analysées	Moyens de contrôle assurance qualité
Canada	18	MCs, Anatoxine-a, Cylindrospermopsine, Saxitoxines	Analyse d'ajouts dosés
Danemark	19	MC-LR, MC-RR, MC-YR, DM-MC-LR, DM-MC-RR, MC-LF, MC-MW, MC-LY, Nodularines	À chaque série d'analyse, analyse d'une gamme d'étalonnage et contrôle du spectre d'absorption et du temps de rétention devant correspondre parfaitement aux standards (analysés à chaque fois) - Participation à un essai inter-laboratoire une fois pour confirmer les résultats
Espagne	20	MCs, Anatoxine-a, Saxitoxines, Cylindrospermopsine	À chaque série d'analyse, analyse de blancs et ajouts dosés - Ajout de nodularine lors des étapes de préparation comme étalon interne - Organisation et participation à des essais inter-laboratoires tous les 2-3 ans
Espagne	21	MCs; Anatoxine-a; Saxitoxines; Cylindrospermopsine	Calibration interlaboratoire - Analyse de standards internes et ajouts dosés à chaque série d'analyse
Estonie	23	MCs	Calibration de l'appareil avec des solutions standards certifiées - Ajouts dosés
Finlande	24	MC-LR, Saxitoxines, Nodularine-R, GTX2 et GTX3	Aucun moyen pour le moment mais ce laboratoire envisage de produire un matériel de référence à utiliser pour chaque série d'analyse
France	26	MC-LR, MC-YR, MC-RR	À chaque série d'analyse, calibration de l'appareil - Analyse de blanc et d'échantillon dopé (conservation des résultats sur des cartes de contrôle) - Accréditation COFRAC de la méthode -Participation à deux essais inter-laboratoires AGLAE par an
France	27	MC-LR, MC-YR, MC-RR, Anatoxine-a, Cylindrospermopsine, Saxitoxine, Nodularine	MC: Quantification à partir d'une gamme d'étalonnage extraite dans les mêmes conditions que les échantillons - ANX; CYL; STX: Rien - Accréditation COFRAC - Participation à des essais inter-laboratoires (circuit AGLAE avec 2 essais par an)
France	28	MCs, Anatoxine-a, Saxitoxines, Cylindrospermopsine	Contrôle des appareils analytiques - Utilisation de standards référencés - Participation à des essais inter-laboratoires
France	29	MC-LR, MC-YR, MC-RR, Nodularine, Anatoxine, Saxitoxine, Cylindrospermopsine	En cours d'accréditation de la méthode par COFRAC
France	30	MCs	Aucun pour le moment

Pays	Code Laboratoire	Toxines analysées	Moyens de contrôle assurance qualité
France	31	MCs	Analyse de chaque échantillon en triplicats (extraction, purification, et 3 répétitions pour chaque échantillon lors de l'analyse PP2A) - Moyen de contrôle pour assurer la qualité d'extraction et de concentration sur cartouche C18 : dopage d'un volume d'eau distillée et brute avec une quantité de MC-LR standard - Pour l'analyse par le test PP2A, réalisation d'une gamme étalon avec la MC-LR pour chaque analyse
France	32	MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LF, MC-LW, NODs	Passage d'une gamme d'étalonnage, d'un contrôle de justesse indépendant de la gamme et de contrôle pour vérifier la non-dérive de l'instrument de mesure
France	33	MCs	Calibration de l'appareil avec des solutions certifiées - Participation à des essais inter-laboratoires
France	34	MCs	Rinçage de l'appareil analytique avant et après chaque série d'analyse à l'aide de MeOH - Calibration de l'appareil à l'aide de solutions standards certifiées
France	35	MCs dans les poissons: MC-LR, MC-RR, MC-LF, MC-LW, MC-YR et NOD et STX dans les coquillages	Laboratoire de référence pour le contrôle des biotoxines marines. Validation des méthodes d'analyse dévelopée avant utilisation en routine - Calibration des appareils analytiques avec des solutions standards certifiées si disponible - Participation à des essais inter-laboratoires une à deux fois par an. À chaque série d'analyse, calibration des appareils avec solutions standards certifiées, ajouts dosés pour tester les cartouches SPE (nouveau lot) et en début de protocole et avant l'analyse pour tester l'effet matrice
France	36	MCs	n.c.
France	37	MCs : MC-LR,RR,YR,LA,LW,LF,LY, NODs, Saxitoxines, Anatoxine-a, Cylindrospermopsine	Validation de la méthode selon la norme T90-210 pour les MC réglementaires qui comprend l'établissement de la fonction d'étalonnage, la vérification de la limite de quantification et l'étude des rendements. A chaque série d'analyse, utilisation d'échantillons dopés à 1 ppb pour l'ensemble des cyanotoxines : acceptation à +/– 20%

Pays	Code Laboratoire	Toxines analysées	Moyens de contrôle assurance qualité
Grèce	43	MC-LR, MC-RR, MC-LA, MC-YR, MC-WR, MC-LY, MC-LW, MC-LF, [D-Asp3] MC-RR, MC-HtyR, [D-Asp3] MC-LR, MC-HilR, Nodularines, Anatoxine-a, Cylindrospermopsine, BMAA	Analyse de solutions contrôle "maison" à chaque série d'analyse
Grèce	44	MC-LR,MC-RR, MCs, Cylindrospermopsine	Analyse d'un ou plusieurs ajouts dosés et d'échantillons certifiés
Grèce	45	MCs, Cylindrospermospine	Analyse d'un ou plusieurs ajouts dosés + de solutions certifiées tous les 2 ou 3 runs d'analyse -Calibration avec des échantillons connus (positif/négatif) analysés en duplicats
Hongrie	46	MC-LR, MC-RR, MC-YR	Calibration avec des solutions standards certifiées - Ajouts dosés
Inde	47	MCs	n.c.
Israël	48	MCs, Cylindrospermospine	Calibration des appareils avec des solutions standards certifiées - Ajouts dosés - Participation à des essais inter-laboratoires
Italie	49	MC-RR, MC-RRdm,MC-LR,MC-LRdm,MC-YR, MC-LF, MC-WR,MC-LA,MC-LW, Anatoxine-a, Cylindrospermopsine	Ajouts dosés sur des solutions standards – Analyse des échantillons ne triplicats - Analyse de solutions stantards et de solution contrôle pour assurer la qualité des résultats à chaque série d'analyse
Japon	50	MC-RR, MC-LR,MC-WR, MC-FR, 7dmMC-LR, Anatoxine-a, Cylindrospermopsine	Ajout de 15N MCs comme étalon de recouvrement pour chaque échantillon
Luxembourg	52	MC-LR, MC-LF, MC-LW, MC-RR, MC-YR, Anatoxine-a	Pour chaque analyse d'échantillons, calibration du HPLC/MS avec des solutions standards – Ajouts dosés réalisés avant extraction - Analyse d'un témoin négatif ou blanc (solvant non dopé)
Macédoine	53	MCs	Selon la procédure ELISA, calibration du spectromère avec des solutions de référence - Analyse de blancs et de contrôles - analyse en réplicats des échantillons
Namibie	54	MCs	n.c.
Norvège	55	MCs; Cylindrospermopsine; Saxitoxines	n.c.
Nouvelle-Zélande	56	MCs/NODs, Anatoxine, Homo-anatoxine, Cylindrospermopsine, Saxitoxines	Ajouts dosés pour vérifier la justesse - Analyse de duplicats pour vérifier la répétabilité - Participation à des essais inter-laboratoires - Accréditation ISO 17025 pour l'analyse des biotoxines par LC/MS
Nouvelle-Zélande	59	MCs, STX, NODs	n.c.

Pays	Code Laboratoire	Toxines analysées	Moyens de contrôle assurance qualité
Pays-Bas	61	MC-LR, MC-RR, MC-YR, Nodularines	n.c.
Pays-Bas	62	dm-7-MC-RR, MC-RR, MC-YR, dm-7-MC-LR, MC-LR, MC-LY, MC-LW, MC-LF, Anatoxine-a, Homoanatoxine-a, Saxitoxine, Cylindrospermopsine, Deoxycylindrospermosine, 7-epi-cylindrospermosine, Nodularines, Gonyautoxins, BMAA	Comparaison de la réponse de l'échantillon à celle d'une solution de référence (injectée au début et à la nfin de chaque série d'analyse) - Analyse d'un blanc pour déterminer une contamination éventuelle
Pologne	63	MCs	Comparaison avec analyse HPLC ou LC/MS auprès d'une autre équipe de l'Université pour avoir une indication sur la présence de toxines - Utilisation de méthodes moléculaires (myc-gene clusters) pour détecter la présence éventuelle de cyanobactéries
Pologne	64	MCs	Analyse de solutions certifiées à chaque série d'analyse - Participation à l'étude inter-laboratoire de Fastner et al. (2002)
Pologne	65	(dm) MC-RR, (dm) MC-LR, MC-YR, MC-LA, MC-LY, NODs, Anatoxine-a, Cylindrospermospine, Saxitoxine, BMAA	Calibration des appareils avec des solutions standards certifiées
Portugal	66	MCs, Anatoxine-a, Cylindrospermopsine	Participation à des essais inter-laboratoire - Utilisation de solutions certifiées pour la calibration - Validation interne des méthodes d'analyse lorsque possible
République Tchèque	67	MCs, Cylindrospermospine	Participation à des essais inter-laboratoires organisés par le Czech Public Health Institute - Laboratoire de référence en République Tchèque - En routine: ajouts dosés
Royaume-Uni	68	MCs	n.c.
Slovénie	69	MC-LR, MC-YR, MC-RR, MC-Seco3 RR	Certification de la méthode d'analyse - Calibration des appareils analytiques avec des solutions standards avant chaque série d'analyse
Slovaquie	70	MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LA, MC-LW, MC-LF, Cylindrospermopsine, Saxitoxine	Certification du laboratoire (contrôle annuel) - Réalisation d'essais inter-laboratoires (tous les 4 ans) et d'échantillons certifiés (à chaque série d'analyse)
Sri Lanka	71	MCs, Cylindrospermospine	Calibration des appareils analytiques - Analyse de solutions standards comme contrôle tout au long de la série d'analyse
Suéde	72	BMAA	Utilisation d'une solution standard deutérée comme étalon interne - Analyse d'un contrôle positif et d'un contrôle négatif (brocoli) à chaque série d'analyse

Pays	Code Laboratoire	Toxines analysées	Moyens de contrôle assurance qualité
Suisse	73	MC-LR, MC-RR, MC-YR,	Analyse des échantillons en triplicats ou en réplicats (x6)
Suisse	74	MC-RR,• [D-Asp3, E-Dhb7] - MC RR, MC-LR, MC-YR	Accréditation ISO 17025 du laboratoire d'analyse - Utilisation d'étalon interne pour l'analyse des MC - Analyse de blancs, de contrôles préparés à partir de solutions standards et d'ajouts dosés
Taïwan	75	MC-LR, MC-RR, Anatoxine-a	n.c.
Taïwan	76	MC-R, MC-RR, MC-YR,MC-LF, MC-LW	n.c.
Turquie	77	MC, Nodularines, Anatoxine-a, Cylindrospermopsine	n.c.
USA	79	MC-LR, MC-LA,MC-YR,MC-RR, Nodularine, Anatoxine-a, Cylindrospermopsine	Analyse de solutions certifiées (lorsque disponible) juste après la courbe de calibration et tous les 10 échantillons afin de vérifier la calibration de l'appareil - Ajouts dosés
USA	80	MC-LR, MC-YR, MC-RR, Nodularine, Anatoxine-a, Cylindrospermopsine	Ajouts dosés - Analyse de solutions standards certifiées comme contrôle
USA	81	MCs, Nodularines, Anatoxine-a, Saxitoxines, Cylindrospermopsine	n.c.
USA	82	MCs, Anatoxine, Cylindrospermospine, Saxitoxines, BMAA, Lyngbyatoxine, Aplysiatoxine	Participation à des essais inter-laboratoires chaque année - Calibration des appareils avec des solutions standards certifiées - Analyse de blancs, d'échantillons dopés en duplicats - Analyse des échantillons en duplicats - Confirmation de certains résultats ELISA par d'autres techniques (LC/MS, LC/FL, LC/UV)
USA	83	MC-LR, Anatoxine-a, Saxitoxine, Cylindrospermopsine	Accréditation ISO du laboratoire pour analyse toxines - ELISA: Participation à des essais d'aptitude (Proficiency Testing) lorsque possible sinon utilisation de solutions certifiées - Calibration à chaque série d'analyse et analyse de blanc et de solutions contrôle - LC/MS: Calibration avec des solutions certifiées à chaque série d'analyse - Analyse de blancs et de blancs fotifiés, ajouts dosés - Analyse des échantillons en duplicats
USA	84	MCs, NODs, Anatoxine-a, Saxitoxines, Cylindrospermopsine, Lyngbyatoxine	n.c.

Pays	Code Laboratoire	Toxines analysées	Moyens de contrôle assurance qualité
USA	85	MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LA, Anatoxine-a, Homoanatoxine-a, Saxitoxine, Cylindrospermopsine, Déoxycylindrospermopsine	ELISA: Participation avec succès à un essai inter-laboratoire pour l'analyse des MCs. HPLC-MS-MS: Utilisation de solutions standards certifiées - Détermination de la LD et de la LQ selon U.S. CFR 40, 136 Part B, U.S. EPA Initial Demonstration of Capability and ongoing assay quality control parameters - Participation à un projet d'essai inter-laboratoires - A chaque série d'échantillons, analyse de blanc, d'ajouts dosés et de contrôle (ELISA: kit) et analyse des échantillons en duplicats
USA	86	MC, Saxitoxine, Cylindrospermopsine	n.c.
USA	87	MC	Méthode en cours de développement, vérification des résultats par analyse de substituts et de standards internes
USA	88	MC-LR, MC-LF, MC-RR, Anatoxine-a, Cylindrospermopsine	Calibration de l'appareil (0,5 - 100 ppb) avec des solutions standards certifiées et validation de la calibration si R2 compris entre 0,994 et 0,998 - Utilisation d'étalons internes (nodularine, leucine-enkephaline et cycloRADfV)
USA	89	MC, Anatoxine-a, Saxitoxines, Cylindrospermopsine	Mise en place des Bonnes Pratiques de Laboratoire - Calibration des appareils - Participation à des comparaisons inter-laboratoires
USA	90	MCs dont MC-RR, MC-YR, MC-LR et MC-LF pour analyse HPLC, Anatoxine-a, Saxitoxines, Cylindrospermopsine	n.c.
USA	91	MCs, Anatoxine-a	Précision laboratoire: analyse de duplicats et validation des résultats si CV < 25% - Précision terrain: collecte de réplicats sur le terrain pour analyse - Justesse: Analyse de blanc et d'ajouts dosés et validation si récupération > 80% - Participation à des essais inter-laboratoires et audit par le Washington State Department Ecology
USA	92	MCs, Cylindrospermospine	Précision laboratoire: analyse de duplicatspour des échantillons et des blancs - Précision terrain: collecte de réplicats sur le terrain pour analyse
USA	93	MCs, Anatoxine-a, Homoanatoxine, Saxitoxine, Néosaxitoxine, Cylindrospermopsine	n.c.
USA	94	MC-LR, MC-RR, MC-LA, MC-LY, Anatoxine-a	n.c.

Pays	Code Laboratoire	Toxines analysées	Moyens de contrôle assurance qualité
USA	95	MCs et NODs	Calibration de l'appareil avec des solutions standards - Ajouts dosés lors de l'étape de purification SPE
USA	96	MCs	Réalisation des analyses (un minimum de réplicats) selon les protocoles standards QA/QC selon le programme Chesapeake Bay Monitoring

**n.c. : non communiqué.*

5.5.1 Validation de la méthode d'analyse

La validation d'une méthode d'analyse est une étape importante pour un laboratoire car elle lui permet de confirmer la validité de ses résultats analytiques. De manière générale, la validation d'une méthode analytique doit être effectuée avant la mise en place d'un protocole de routine et doit être répétée lorsqu'un changement de procédure, d'instrument ou de personnel est susceptible d'affecter les résultats de l'analyse. La validation d'une méthode analytique doit être réalisée de préférence sur une série d'échantillons la plus représentative possible de la gamme des eaux (eaux de consommation et/ou eaux récréatives) que le laboratoire aura à analyser dans le futur.

La validation d'une méthode analytique comprend plusieurs étapes :

- Description d'un protocole analytique complet et détaillé;
- Identification des étapes pouvant être à l'origine d'incertitude à l'aide d'un diagramme d'Ishikawa (Figure 5.9);
- Définition des références bibliographiques ayant permis le développement de la méthode analytique;
- Validation de la méthode analytique : différents paramètres doivent être pris en compte afin de valider la méthode analytique, ils dépendent du type de méthode (qualitative, semi-quantitative ou quantitative);

Cette étape de validation n'est pas nécessaire pour chaque série d'échantillons; des mesures de contrôle et de certification des résultats doivent cependant être effectuées pour chaque série d'analyse afin de garantir le maintien des performances.

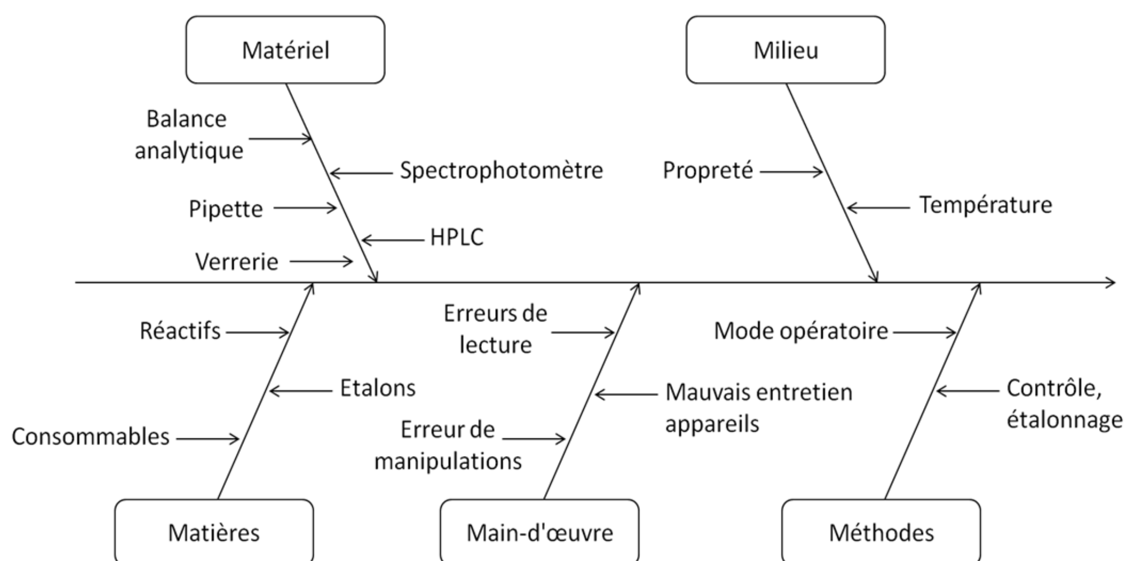


Figure 5.9 **Exemple de diagramme d'Ishikawa permettant d'identifier les risques d'incertitude d'une méthode analytique donnée**

Tableau 5.33 **Paramètres devant être étudiés pour permettre la validation des méthodes qualitatives, semi-quantitative ou qualitative (tiré de Bazin, 2013)**

Paramètre	Méthode qualitative	Méthode semi-quantitative	Méthode quantitative
Spécificité	X	X	X
Justesse			X
Sensibilité (LD et LQ)	X	X	X
Contamination entre échantillons	X	X	X
Fidélité (répétabilité et reproductibilité)		X	X
Linéarité		X	X
Domaine d'analyse		X	X
Stabilité	X	X	X
Robustesse	X	X	X
Interférences	X	X	X
Corrélation avec méthode de référence	X	X	X

5.5.2 Mesures de contrôle et de certification des résultats utilisés en routine

Analyse d'un ou plusieurs blanc(s) : l'analyse de blancs « *de terrain* » et/ou de blanc « *de laboratoire* » permet respectivement de déterminer la présence de contamination liée à l'échantillonnage, ou au stockage, à la préparation et à l'analyse des échantillons. Elle permet également de s'assurer que les interférences éventuelles liées aux réactifs ne compromettront pas l'intégrité des résultats (Swanepoel et al. 2008). Il est important que le blanc de laboratoire soit soumis aux mêmes conditions analytiques que les échantillons. Par conséquent, il est fortement recommandé de réaliser un blanc de laboratoire pour chaque étape de préparation et ce chaque jour où un échantillon sera préparé. James et al. (2011) recommandent que les blancs de laboratoire représentent au moins 10% des échantillons analysés.

Linéarité – Calibration des appareils analytiques : dans le cas de méthodes analytiques quantitatives, une calibration des appareils à chaque série d'analyse est fortement recommandée. Les solutions standards doivent être préparées avec la plus grande précision à l'aide micropipettes régulièrement calibrées. Afin d'éviter tout risque de contamination en eau par condensation des solutions standards, il est important d'attendre que les vials de solution standard soit à température ambiante avant de les ouvrir. Cette calibration permet ensuite de déterminer les teneurs en cyanotoxines par comparaison des temps de rétention et des spectres UV ou des ratios masse/charge avec les solutions standards. Les courbes de calibration permettent d'exprimer la concentration en cyanotoxines C (exprimée en $\mu g.L^{-1}$) et la réponse x de l'appareil :

- Linéaire passant par l'origine : C = a x
- Linéaire avec une ordonnée à l'origine positive : C = a x + b
- Exponentielle : ln (C) = a ln (x) + b

La linéarité de la courbe de calibration est caractérisée par la pente de la courbe (a), l'ordonnée à l'origine (b) et le coefficient de régression (r^2) (James et al. 2011). Certains laboratoires ont définis des valeurs dites « *acceptables* » au-delà desquelles la courbe de calibration ne peut être validée et doit être recommencée (généralement $r^2 > 0,9$).

La norme ISO 20179:2005 préconise la calibration des appareils analytiques à l'aide de solutions standards certifiées. Cependant, cette norme recommande également de vérifier la concentration en

cyanotoxines réellement présentes dans les solutions standards en raison de la qualité variable de ces solutions standards actuellement disponibles sur le marché (présence d'impuretés, concentration différente de celle indiquée). La procédure suivante peut être suivie afin de vérifier la concentration en cyanotoxines des solutions standards (ISO 2005):

- Dissoudre une quantité précise d'une solution standard contenant une seule cyanotoxine dans du MeOH pur grade HPLC;
- Enregistrer le spectre d'absorption entre 220 et 250 nm à l'aide d'un spectrophotomètre en utilisant une cellule en quartz de 1 cm;
- Calculer la concentration massique en cyanotoxine, C_i, exprimée en $\mu g.L^{-1}$, en suivant l'Équation 5.4.

Équation 5.4 $$C_i = \frac{A_{max} \times M_i \times 1\,000}{\varepsilon_i \times d}$$

Où :

A_{max} représente l'absorbance mesurée au maximum de la courbe d'absorption;

Mi représente la masse molaire de la toxine considérée, en $g.mol^{-1}$ [$M_{(MC\text{-}LR)} = 994\ g.mol^{-1}$; $M_{(MC\text{-}YR)} = 1\,044\ g.mol^{-1}$ et $M_{(MC\text{-}RR)} = 1\,037\ g.mol^{-1}$];

εi représente l'absorptivité molaire de la toxine considérée dans MeOH, exprimée en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ [$\varepsilon_{(MC\text{-}LR)} = \varepsilon_{(MC\text{-}YR)} = \varepsilon_{(MC\text{-}RR)} = 39\,800\ L.mol^{-1}.cm^{-1}$];

d représente la largeur de la cuve en quartz, exprimée en cm.

L'une des difficultés d'une bonne calibration des appareils est le manque de disponibilité de solutions standards pour certaines toxines (anatoxines, cylindrospermopsines, microcystines, saxitoxines). De plus, des études ont mis en évidence la présence d'impuretés dans certaines solutions standards commercialisées (Meriluoto et Spoof, 2008). Le Tableau 5.34 présente les principales solutions standards actuellement disponibles sur le marché et utilisées par les laboratoires.

Tableau 5.34 Récapitulatif des solutions standards de cyanotoxines (anatoxine-a, cylindrospermopsine, microcystines, nodularines, saxitoxines) disponibles actuellement sur le marché

Fournisseur	Molécule analysée	N° Produit	Pureté	Quantité	Coût ($ US)
Abraxis					
	Anatoxine-a Fumerate	ANTXASTD		1 mg	500
	(Homo)Anatoxine-a (10 µg.mL^{-1})	HOMO-ANATOXIN-a-S		0,5 mL	300
	Cylindrospermopsine	CYLINDROSTD-0.5		0,5 mg	550
	Cylindrospermopsine (10 µg.mL^{-1})	CYLINDROSTD-S		1 mL	175
	Déoxycylindrospermopsine (10 µg.mL^{-1})	DEOXYCYLOINDROSTD-S		0,5 mL	300
	MC-LA (10 µg.mL^{-1})	MICROLASTD-S		1 mL	175
	MC-LR	MICROLRSTD-0.5		0,5 mg	450
	MC-LR (10 µg.mL^{-1})	MICROLRSTD-S		1 mL	150
	MC-RR (10 µg.mL^{-1})	MICRORRSTD-S		1 mL	175
	MC-YR (10 µg.mL^{-1})	MICROYRSTD-S		1 mL	175
	Nodularines (10 µg.mL^{-1})	NODULARSTD-S		1 mL	175
	Saxitoxines (10 µg.mL^{-1})	STXSTD	MeOH	1 mL	250
	MC-LR Échantillon certifié	PN 422011	Échantillon A : < 0,15 ppb; Échantillon B : 2 ppb; Échantillon C : 20 ppb.	n.c	300
A.G. Scientific					
	Anatoxine-a Fumerate	A-1065	>95%	1 mg	205
BeagleBioProducts					
	MC-LR (Solide ou liquide)		>95%		
	MC-YR (Solide ou liquide)		>95%		
	MC-LA (Solide ou liquide)		>95%		
	MC-RR (Solide ou liquide)		>95%		
Calbiochem					
	InSolution™ Microcystin-LR (250 µg.100 µL^{-1})	475821	≥ 95% HPLC	-	-
	Microcystin-LF, *Microcystis aeruginosa*	475814	≥ 95% HPLC	-	-
	Microcystin-LR, *Microcystis aeruginosa*	475815	≥ 95% HPLC	-	-
	Microcystin-LW, *Microcystis aeruginosa*	475818	≥ 95% HPLC	-	-
	Microcystin-RR, *Microcystis aeruginosa*	475816	≥ 95% HPLC	-	-
	InSolution™ Nodularin	488003	≥ 95% HPLC	-	-
	Vérification identité par RMN et MS/MS				
	MC-LR (10 µg.mL^{-1})	MCLR-a	>95 % (HPLC)	1 mL	152
	MC-RR (10 µg.mL^{-1})	MCRR-a	>95 % (HPLC)	1 mL	179
	MC-YR (10 µg.mL^{-1})	MCYR-a	>95 % (HPLC)	1 mL	195

Fournisseur	Molécule analysée	N° Produit	Pureté	Quantité	Coût ($ US)
	MC-LR, MC-RR, MC-YR (5 µg.mL^{-1} chacun)	MC-mas	>95 % (HPLC)	1 mL	230
	MC-LW (10 µg.mL^{-1})	MCLW-a	>95 % (HPLC)	1 mL	213
	MC-LF (10 µg.mL^{-1})	MCLF-a	>95 % (HPLC)	1 mL	213
	[D-Asp3,(E)-Dhb7]MC-RR (10 µg.mL^{-1})	MCADRR-a	>95 % (HPLC)	1 mL	179
	Nodularine (10 µg.mL^{-1})	NOD-a	>95 % (HPLC)	1 mL	195
	Cylindrospermopsine (10 µg.mL^{-1})	CYN-a	>95 % (HPLC)	1 mL	200
DHI	*Vérification concentration par MS*				
	MC-LR	PPS-MCLR		1 mL	145
	MC-RR	PPS-MCRR		1 mL	160
	MC-LF	PPS-MCLF		1 mL	209
Instable = envoyé dans	MC-LW	PPS-MCLW		1 mL	209
la glace	MC-LY	PPS-MCLY		1 mL	209
	Nodularine	PPS-NODU		1 mL	175
Enzo	*Vérification identité par MS*				
	MC-LF	ALX-350-081-C025	≥ 95% HPLC	25 µg	156
	MC-LF	ALX-350-081-C100	≥ 95% HPLC	100 µg	478
	MC-LR	ALX-350-012-C050	≥ 95% HPLC	50 µg	40
	MC-LR	ALX-350-012-C100	≥ 95% HPLC	100 µg	62
	MC-LR	ALX-350-012-C500	≥ 95% HPLC	500 µg	240
	MC-LR	ALX-350-012-M001	≥ 95% HPLC	1 mg	426
	MC-LW	ALX-350-080-C025	≥ 95% HPLC	25 µg	156
	MC-LW	ALX-350-080-C100	≥ 95% HPLC	100 µg	440
	MC-LY	ALX-350-148-C025	≥ 95% HPLC	25 µg	155
	MC-LY	ALX-350-148-C100	≥ 95% HPLC	100 µg	445
	MC-RR	ALX-350-043-C050	≥ 95% HPLC	50 µg	84
	MC-RR	ALX-350-043-C100	≥ 95% HPLC	100 µg	155
	MC-RR	ALX-350-043-C250	≥ 95% HPLC	250 µg	294
	MC-RR	ALX-350-043-C500	≥ 95% HPLC	500 µg	585
	MC-RR	ALX-350-043-M001	≥ 95% HPLC	1 mg	1 040
	MC-WR	ALX-350-167-C025	≥ 95% HPLC	25 µg	173
	MC-WR	ALX-350-167-C100	≥ 95% HPLC	100 µg	375
	MC-YR	ALX-350-044-C025	≥ 95% HPLC	25 µg	147
	MC-YR	ALX-350-044-C100	≥ 95% HPLC	100 µg	270
	MC-LA	ALX-350-096-C025	≥ 95% HPLC	25 µg	161
	MC-LA	ALX-350-096-C100	≥ 95% HPLC	100 µg	248
	MC-LA, -LR, -LF, -LW, -RR, -YR, Nodularine	ALX-850-325-KI01	≥ 95% HPLC	25 µg MC-LA, 25 µg MC-LF, 25 µg MC-LR, 25 µg MC-LW, 25 µg MC-LY, 50 µg MC-RR, 25 µg MC-YR, 50 µg Nodularine	648
	MC-LR (Analytical Standard)	ALX-350-431-C010	≥ 99% HPLC	10 µg	162

Fournisseur	Molécule analysée	N° Produit	Pureté	Quantité	Coût ($ US)
Enzo	MC-RR (Analytical Standard)	ALX-350-432-C010	≥ 99% HPLC	10 µg	190
GreenWater Laboratories					
	MC-LR	-	>95 % (HPLC)	100 - 500 µg 1 mg	-
	MC-RR	-	>95 % (HPLC)	100 - 500 µg 1 mg	-
	MC-LA	-	>95 % (HPLC)	100 µg	-
	MC-YR	-	>95 % (HPLC)	100 µg	-
	Nodularine	-	>95 % (HPLC)	100 µg	-
	Cylindrospermopsine	-	>95 % (HPLC)	100 - 500 µg 1 mg	-
LGC Standard					
	Saxitoxin Dihydrochloride	RM 8642 FDA	-	1,2 mL	-
NRC-CNRC (Halifax)	Vérification identité et pureté par RMN, LC-UVD, CE-UVD et LC-CLND				
	Cylindrospermopsine	CRM-CYN	-	0,5 mL	110
	Anatoxine-a	CRM-ATX	-	0,5 mL	112
	[Dha7]-Microcystine-LR	CRM-dmMCLR	-	0,5 mL	130
	Microcystine-LR	CRM-MCLR	-	0,5 mL	86
	Microcystine-RR	CRM-MCRR	-	0,5 mL	79
	Nodularine-R	CRM-NODR	-	0,5 mL	79
Novakits					
	MC-LR	-	-	0,1 - 1 mg	110 - 523
	MC-RR	-	-	0,1 - 1 mg	213 - 1033
	MC-YR	-	-	0,1 - 0,5 mg	344 - 1 485
	MC-LA	-	-	0,1 mg	344
	Nodularine	-	-	0,1 - 0,5 mg	344 - 867
	Cylindrospermopsine	-	-	0,1 - 1 mg	379 - 1 170
	Saxitoxine	-	-	0,1 mg	482
	Saxitoxine-N15 (5 µg.L^{-1})	-	-	0,5 mL	482
	MC-LR (10 µg.L^{-1})	STDMICROLRD	-	1 mL	200
	MC-RR (10 µg.L^{-1})	STDMICRORRD	-	1 mL	213
	MC-YR (10 µg.L^{-1})	STDMICROYRD	-	1 mL	227
	MC-LA (10 µg.L^{-1})	STDMICROLAD	-	1 mL	227
	MC-LF (5 µg.L^{-1})	STDMICROLFD	-	1 mL	273
	MC-LY (5 µg.L^{-1})	STDMICROLYD	-	1 mL	273
	Demethyl-MC-LR (5 µg.L^{-1})	STDFMMCLR5	-	1 mL	273
	Demethyl-MC-RR (5 µg.L^{-1})	STDFMMCRR5	-	1 mL	273
	Nodularine (10 µg.L^{-1})	STDNODULA-R	-	1 mL	216
	Cylindrospermopsine (12 µg par ampoule)	NRC-CRM-CYN	-	0,5 mL	220

Fournisseur	Molécule analysée	N° Produit	Pureté	Quantité	Coût ($ US)
Novakits	Anatoxine-a fumarate (10 µg.L^{-1})	STDANATOX-D	-	1 mL	310
	Anatoxine-a (5 µg.L^{-1})	NRC-CRM-ATX	-	0,5 mL	220
	Homo-anatoxine (10 µg.L^{-1})	STDHANTX5	-	0,5 mL	296
	BMAA (10 µg.L^{-1})	STDBMAA-D	-	1 mL	379
	Saxitoxine (12 µg par ampoule)	NRC-CRM STX	-	0,5 mL	220
	Néosaxitoxine (10 µg par ampoule)	NRC-CRM NeoSTX	-	0,5 mL	220
	MC-LR/RR/YR (5 µg de chaque)	PM3MC5	-	1 mL	296
	MC-LR/RR/YR (10 µg de chaque)	PM3MC10	-	1 mL	516
	MC-LR/RR/YR/LA (5 µg de chaque)	PM4MC5	-	1 mL	379
	MC-LR/RR/YR/LA/LF/LW/ LY/NOD (5 µg de chaque)	STD-FULLMC	-	1 mL	957
Sigma Aldrich	*Vérification identité par MS*				
	MC-RR, -LR, -YR (5 µg.mL^{-1})	33578-1mL	-	1 mL	556
	MC-LR (10 µg.mL^{-1})	33893-1mL-R	-	1 mL	449
	MC-RR	M1537-25ug	> 90% HPLC	25 µg	286,5
	MC-RR (10 µg.mL^{-1})	33577-1mL	-	1 mL	546
	MC-YR	M4069-100ug	-	100 ug	381,5
	MC-YR (10 µg.mL^{-1})	33576-1mL	-	1 mL	546
	MC-LW (5 - 8 µg.mL^{-1})	33763-1mL	-	1 mL	740
	MC-LF (5 - 8 µg.mL^{-1})	33762-1mL	-	1 mL	631
	MC-LY (2 - 8 µg.mL^{-1})	33759-1mL	-	1 mL	740
	MC-LA à partir de *Microcystin Aeroginosa*	M4194-100ug	-	100 µg	381,85

Vérification continue de la calibration: il est important de vérifier en continu la calibration des appareils analytiques grâce à l'analyse de solutions standards au minimum tous les 10 échantillons. Toutes les solutions de calibration utilisées pour établir la courbe de calibration doivent être utilisées comme « *solution standard de vérification* » et ce, tout au long de la série d'analyse. Le pourcentage de récupération (% R) est ensuite calculé à partir de l'Équation 5.5. Cette vérification continue de la calibration permet de déterminer s'il y a une dérive de l'appareil. Si la valeur du pourcentage de récupération diffère de ± 20% par rapport à la valeur théorique attendue, l'appareil analytique doit être calibré de nouveau avant de pouvoir poursuivre les analyses (James et al. 2011).

Équation 5.5 $\% R = \frac{Cs}{Ct} \times 100$

Où :

Cs représente la concentration en toxine mesurée pour la solution standard de vérification, exprimée en $\mu g.L^{-1}$;

Ct représente la concentration thérorique ou attendue en toxine présente dans la solution standard de vérification, exprimée en $\mu g.L^{-1}$.

Sensibilité – Limites de détection et de quantification : il est important de caractériser la sensibilité des méthodes d'analyse en déterminant les limites de détection et de quantification. Ces valeurs limites permettent de valider les résultats obtenus lorsque les concentrations mesurées sont supérieures aux limites de quantification. De manière générale, il est recommandé de déterminer les limites de détection et de quantification à chaque changement de courbe de calibration en analysant plusieurs fois (n = 7 à 10) un échantillon contenant une faible concentration en toxine. Selon James et al. (2011), lorsque l'analyse des toxines est réalisée à l'aide de tests immunologiques de type ELISA, il est recommandé de déterminer les limites de détection et de quantification en analysant 7 fois un échantillon dopé avec une concentration en toxines cinq fois supérieure à la limite de détection fournies par le fournisseur.

Une fois les essais réalisés, la limite de détection, exprimée en $\mu g.L^{-1}$, est calculée à l'aide de l'Équation 5.6 (CEAEQ 2009):

Équation 5.6 $LD = 3 \times S$

Où :

S représente l'écart-type des essais réalisés en réplicats.

Une fois les essais réalisés, la limite de quantificiation, exprimée en $\mu g.L^{-1}$, est calculée à l'aide de l'Équation 5.7 (CEAEQ 2009):

Équation 5.7 $LD = 10 \times S$

Où :

S représente l'écart-type des essais réalisés en réplicats.

Afin de valider la démarche de détermination de la limite de détection, il est important de calculer le ratio de conformité R en se basant sur l'Équation 5.8 (CEAEQ 2009).

Équation 5.8 $R = \frac{\bar{x}}{LD}$

Où $\bar{x}$ représente la moyenne arithmétique des essais réalisés en réplicats.

LD représente la limite de détection calculée

Si $R < 4$ Le ratio indique que la limite de détection réelle de la méthode est plus élevée que celle estimée. Les essais doivent être recommencés en modifiant la concentration de l'échantillon ;

Si $4 < R < 10$ La concentration de l'échantillon utilisée est adéquate ;

Si $R > 10$ Le ratio indique que la limite de détection réelle de la méthode est plus basse que celle estimée. Les essais doivent être recommencés en modifiant la concentration de l'échantillon.

Fidélité – Réplicabilité, Répétabilité et Reproductibilité : dans le cas de méthodes analytiques semi-quantitatives ou quantitatives, la justesse de la méthode analytique doit être évaluée par l'étude de sa réplicabitlié (fidélité pour des essais indépendants réalisés le même jour avec la même méthode, dans le

même laboratoire et par le même technicien sur les mêmes appareils et sur le même échantillon), sa répétabilité (fidélité mesurée pour des essais indépendants réalisés avec la même méthode sur le même échantillon, mais dont l'un des éléments suivants est différent : le jour, l'analyste, l'appareil), et sa reproductibilité (fidélité mesurée pour des essais indépendants réalisés sur le même échantillon par des techniciens différents, des appareils différents et dans des laboratoires différents). Il est recommandé d'évaluer la réplicabilité et la répétabilité de la méthode analytique pour chaque série d'analyse, et d'évaluer la reproductibilité de temps en temps. De manière générale, les laboratoires étudient la reproductibilité de leur méthode analytique en faisant varier plusieurs éléments (jour, technicien et appareils) et dans certains cas en faisant faire l'analyse dans un autre laboratoire. Cette dernière option est plus rare en raison des coûts d'analyse élevés et des variations inter-laboratoires importantes qui ne sont pas obligatoirement dues à un manque de fidélité de la méthode d'analyse développée par le laboratoire voulant valider sa méthode.

Afin de déterminer la réplicabilité, la répétabilité et/ou la reproductibilité d'une méthode, il est recommandé de réaliser un nombre important d'essais sur un même échantillon (30 à 50 essais). Une fois la série d'essais réalisée, un test statistique de type Grubbs est effectué afin d'identifier les valeurs qui pouraient être aberrantes. Une fois les valeurs aberrantes écartées, la réplicabilité, la répétabilité et/ou la reproductibilité, exprimée en %, sont calculées selon l'Équation 5.9.

Équation 5.9 $R = 100 \times \frac{s}{m}$

Où :

s représente l'écart-type des concentrations en toxines mesurées pour les 30 – 50 essais;

m représente la moyenne des concentrations en toxines mesurées pour les 30 – 50 essais.

Cependant, le nombre élevé d'essais requis pour établir une bonne réplicabilité, répétabilité et/ou reproductibilité limite son application dans le cas d'analyses de routine. Les laboratoires d'analyse réduisent le nombre d'essais devant être réalisé en réplicats entre 3 et 5, certains laboratoires réalisent l'analyse de tous leurs échantillons en triplicats ou en quintuplats afin de confirmer la validité de leurs

résultats. Une fois les essais réalisés en triplicats ou en quintuplats, le coefficient de variation des résultats obtenus, exprimé en %, peut être calculé selon l'Équation 5.10.

Équation 5.10 $R = 100 \times \frac{S}{m}$

Où :

S représente l'écart-type des concentrations en toxines mesurées pour les essais menés en triplicats ou en quintuplats;

m représente la moyenne des concentrations en toxines mesurées pour les essais menés en triplicats ou en quintuplats.

Le coefficient de variation est ensuite comparé à une valeur limite (définie par le laboratoire d'analyse) ou aux valeurs de réplicabilité, répétabilité et/ou reproductibilité obtenues lors de la validation de la méthode analytique, afin de valider ou d'invalider les résultats obtenus.

Justesse – Ajouts dosés : dans le cas de méthodes analytiques quantitatives, l'étude de la justesse de la méthode à l'aide d'ajouts dosés est fortement recommandée, permettant au laboratoire de confirmer la validité de ses résultats. Afin de pouvoir réaliser correctement des ajouts dosés, il est recommandé de préparer une solution mère de dopage en pipetant précisément un volume connu pour chacune des solutions standards dont les toxines sont analysées. Afin d'éviter tout risque de contamination en eau par condensation des solutions standards, il est important d'attendre que les vials soit à température ambiante avant de les ouvrir. Cette solution doit être conservée dans un vial hermétique à -16°C pour éviter toute évaporation. Afin de s'assurer que le vial est fermé hermétiquement, il est recommandé de le peser et d'enregistrer tout changement de masse durant la conservation de la solution standard de dopage.

Afin de préparer les échantillons dopés, un volume précis de la solution de dopage doit être prélevé à l'aide de micropipettes régulièrement calibrées puis introduit dans un vial contenant un volume connu d'eau Milli-Q ou d'eau du robinet (donne une information sur la précision de la méthode) ou d'échantillon à analyser (donne une information sur la précision et la spécificité de la méthode). Les laboratoires d'analyse recommandent de réaliser des ajouts dosés sur différents échantillons, et ce aux

différentes étapes de préparation (début, étape de purification sur cartouche SPE pour tout nouveau lot de cartouche), et un autre dopage uniquement au moment de la quantification pour tester l'effet de matrice. Pour chacun des échantillons dopés, les résultats obtenus permettent de calculer la différence ou le pourcentage de de récupération, % R, entre la valeur ajoutée théorique et celle mesurée selon l'Équation 5.11.

Équation 5.11 $\% R= \frac{C_T - C_M}{C_T} \times 100$

Où :

C_T représente la concentration théorique en cyanotoxine ajoutée, exprimée en µg.L^{-1} ;

C_M représente la concentration mesurée réellement en cyanotoxine ajoutée, exprimée en µg.L^{-1}.

L'analyse d'échantillons dopés lors des étapes de préparation des échantillons (début, purification sur cartouche SPE) permet également d'évaluer le taux de récupération moyen des toxines présentes dans les échantillons (James et al. 2011). De manière générale, les laboratoires interrogés estiment que le taux de récupération des toxines se situe entre 70 et 120% en fonction de la toxine et de l'étape de préparation considérée.

La norme ISO 20179:2005 préconise l'analyse d'échantillons dopés afin d'assurer la qualité des résultats obtenus. Pour ce faire, cette norme recommande de pipeter un volume précis (200 µL) d'une solution standard commerciale et de le transférer dans une fiole jaugée de 500 mL. La fiole est ensuite complétée jusqu'au trait de jauge avec de l'eau du robinet (pour évaluer la précision de l'appareil analytique) ou avec un échantillon d'eau extrait (pour évaluer la précision de la méthode analytique). Il est important de bien homogénéiser la solution obtenue. La concentration de l'échantillon dopée est de 1 µg.L^{-1} en MCs.

Analyse de matériau de référence certifié : de manière générale, les matériaux de référence certifiés sont des outils essentiels, largement utilisés dans les laboratoires d'analyse environnementale à travers le monde, pour confirmer l'exactitude et la fiabilité des méthodes analytiques (préparation des échantillons + méthode d'analyse). L'intégration de matériaux de référence certifiés au cours de chaque

série d'analyse permet de confirmer ou d'infirmer la validité des résultats analytiques obtenus. À ce jour, peu de matériaux de référence certifiés contenant une ou plusieurs cyanotoxines sont disponibles sur le marché. Au cours de ces dernières années, le « *National Research Council's Institute for Marine Biosciences* » a développé et commercialisé une large variété de solutions standards et de matériaux de référence certifiés stables (stabilité testée sur six mois), purs (aucune impureté détectée par analyse RMN) et homogènes (concentration vérifiée par analyse HPLC-Fluorescence et LC-MS) pour les saxitoxines (Thomas et al. 2002). Le Tableau 5.35 présente les différents matériaux de référence certifiés actuellement commercialisés par le NRC-CRMP. Plus récemment, un matériau de référence certifié a été développé par le « *National Institute for Environmental Studies* » (NIES) pour l'analyse des microcystines à partir de culture de *Microcystis aeruginosa*. Le matériau de référence, CRM N°26 développé par le NIES, contient sept variantes différentes de microcystines : [D-Asp^{3},Dha^{7}]microcystine-RR, [Dha^{7}]microcystine-RR, [Dha^{7}]microcystine-tétrahydro-TyrR, [Dha^{7}]microcystine-YR, [Dha^{7}]microcystine-LR, [D-Asp^{3},Dha^{7}]microcystine-LR et [Dha^{7}]microcystine-HilR. Selon l'étude réalisée par Sano et al. (2010), le matériau de référence certifié CRM N°26 peut être utilisé pour confirmer ou infirmer l'exactitude et la fiabilité des méthodes analytiques permettant la détection, l'identification et la quantification de microcystines.

Tableau 5.35 Récapitulatif des matériaux de référence certifiés commercialisés par le NRC-CRPM pour les saxitoxines

Molécule analysée	**N° Produit**	**Pureté**	**Quantité**	**Coût ($ US)**
Saxitoxine	**CRM-STX-f**	-	0,5 mL	160
Néosaxitoxine	**CRM-NEO-c**	-	0,5 mL	160
N-sulfocarbamoyl-gonyautoxine-2 et -3	**CRM-C1-2-b**	-	0,5 mL	160
Décarbamoygonyautoxine-2 et -3	**CRM-dcGTX2-3**	-	0,5 mL	160
Decarbamoylnéosaxitoxine	**CRM-dcNEO**	-	0,5 mL	160
Decarbamoylsaxitoxine	**CRM-dcSTX**	-	0,5 mL	160
Gonyautoxine-1 et -4	**CRM-GTX1-4-c**	-	0,5 mL	160
Gonyautoxine-2 et -3	**CRM-GTX2-3-c**	-	0,5 mL	160
Gonyautoxine-5	**CRM-GTX5-b**	-	0,5 mL	160

Contrôle fréquent des appareils analytiques : il est important de contrôler en permanence le matériel utilisé pour la préparation, la détection, l'identification et la quantification des cyanotoxines afin de confirmer la validité des résultats obtenus. La fréquence des contrôles métrologiques des appareils et

du matériel peut être hebdomadaire, mensuelle, semestrielle ou annuelle. Différents appareils analytiques et matériels doivent être contrôlés et calibrés par les laboratoires :

- Congélateur et/ou réfrigérateur : enregistrement régulier des températures des congélateurs et/ou réfrigérateurs;
- Balances analytiques : calibration annuelle à l'aide de poids certifiés et contrôle mensuel recommandé;
- Micropipettes : calibration annuelle des micropipettes à l'aide de balance analytique de précision et contrôle des micropipettes à chaque usage sur les volumes utilisés;
- Chronomètres : vérification des chromnomètres utilisés lors de la préparation des échantillons ou de la détection ou la quantification réalisée par les tests immunologiques ELISA afin de respecter toujours les temps d'attente ou de réaction;
- pH-mètre : étalonnage des pH-mètres à chaque utilisation avec des solutions standards certifiées et non périmées et entretien régulier des sondes pH;
- Sonde à ultrasons : contrôle annuel recommandé. Ce contrôle est réalisé en soumettant un échantillon de biomasse algale à analyser dans les conditions habituelles d'ultrasonication, puis de vérifier que la lyse cellulaire est complète par observation de l'échantillon au microscope suivi par une analyse des toxines pour vérifier que ces dernières n'ont pas été détruites ou détériorées par la sonication;
- HPLC : entretien régulier de l'appareil.

5.5.3 Comparaison Inter-Laboratoires

Pour déterminer la performance des laboratoires à détecter, identifier et/ou quantifier les toxines de manière adéquate, des comparaisons inter-laboratoires (appelées également essais d'aptitude, ring tests, proficiency tests) doivent être mis en place. Le but des essais inter-laboratoires est de mettre en évidence ou non la cohérence des informations analytiques entre les différents laboratoires participants, et de souligner au besoin tout problème analytique rencontré par un des laboratoires participants. La réalisation d'essais inter-laboratoires permet aux laboratoires participants de tester les différentes méthodes analytiques utilisées (robustesse, justesse, précision, limite de détection et de quantification, reproductibilité, répétabilité, etc.) et d'identifier les paramètres pouvant influencer l'exactitude des résultats obtenus. De manière générale, des essais inter-laboratoires sont réalisés annuellement ou tous les 2 ans aux niveaux International, Européen ou National.

5.5.3.1 Exemple d'AGLAE (Association Générale des Laboratoires d'Analyse en Environnement, Europe)

Cette association fondée en 1993 compte près de 500 laboratoires-membres dont 10% se trouvent à l'international. Depuis 2006, AGLAE propose un Programme de comparaison inter-laboratoires (2 essais inter-laboratoires par an) portant sur les « *Toxines de cyanobactéries dans les eaux naturelles* ». Ce Programme permet aux différents laboratoires Européens participants (16 laboratoires au total pour la campagne de 2013) de tester la performance de leurs méthodes analytiques (ELISA ou HPLC) pour l'identification et la quantification des microcystines MC-LR, MC-RR et MC-YR. L'association est en charge de la préparation des échantillons (grand volume d'échantillon divisé par le nombre de laboratoires participants, chaque échantillon contient des concentrations en MC-LR, MC-RR et MC-YR similaires aux niveaux de pollution retrouvés habituellement dans les échantillons d'eaux naturelles) et de l'étude statistique des résultats obtenus par les différents laboratoires (les résultats obtenus par les essais ELISA ne sont pas pris en compte lors de l'étude statistique). Les résultats obtenus par les laboratoires sont jugés corrects lorsque ces derniers sont compris dans l'intervalle : valeur moyenne ± 2 x écart-type, validant ainsi la méthode d'analyse du laboratoire participant.

5.5.3.2 Exemple du CRITT-UPC (Center for Research and Innovation in Toxicology de la Technical Universidad of Catalunya, Europe)

Depuis 2004, le CRITT-UPC propose un programme de comparaison inter-laboratoires portant sur la détermination des microcystines dans des échantillons d'eau prêts à être analysés. Ce programme permet aux différents laboratoires participants de tester la performance de leurs méthodes analytiques pour la quantification des microcystines, et de vérifier/confirmer leur système de contrôle d'assurance qualité. De plus, cet exercise inter-laboratoires permet d'obtenir des données statistiques sur les variations intra- et inter-laboratoires lors de la quantification de microcystines réalisées sur diffférents types d'échantillons d'eau à l'aide de diverses méthodes analytiques (méthodes enzymatiques, immunologiques ou chromatographiques). Afin d'organiser cet exercise inter-laboratoires, le CRITT-UPC réalise les étapes de préparation des échantillons d'eau puis envoie les séries d'échantillons d'eau aux laboratoires participants. Après réception des échantillons, les laboratoires d'analyse ont pour consigne de congeler les échantillons jusqu'à la date prévue pour l'analyse. Une décongélation en transférant les échantillons dans un réfrigérateur à 4°C est recommandé la veille de l'analyse afin d'éviter une

décongélation trop brutale et par conséquent une dégradation éventuelle de l'échantillon. Les laboratoires participants doivent analyser à des dates différentes 3 séries d'analyse de 3 échantillons (les séries sont identiques mais l'ordre des échantillons est différent) ce qui permet d'évaluer les variations intra- (série identique) et inter-laboratoires. Les techniques utilisées par les laboratoires participants sont l'analyse par HPLC (calibration avec des standards DHI ou LG Standard) ou les tests ELISA (utilisation des kits Envirogard). Ribo et Riva (2006) ont publié les résultats de la première édition de ces essais inter-laboratoires mettant en évidence que les concentrations mesurées étaient toutes inférieures à la valeur théorique (MC-LR : théorique 1 µg.L^{-1}, obtenue 0,76 ± 0,19 µg.L^{-1} ; MC-RR : théorique 2 µg.L^{-1}, obtenue 1,18 ± 0,28 µg.L^{-1} ; MC-LR+RR : théorique 4 µg.L^{-1}, obtenue 2,86 ± 0,87 µg.L^{-1}). Une sous-estimation plus importante des concentrations en MC-RR était observée comparativement aux concentrations en MC-LR obtenues (variante de microcysitine mieux quantifiée par tous les laboratoires). Les variations inter-laboratoires variaient de 15,4% (MC-LR) à 23,3% (MC-LR+RR).

À notre connaissance (réponse aux questionnaires), il n'existe pas d'organisme responsable de l'organisation d'essais inter-laboratoires aux USA, en Inde, en Slovénie et aux Pays-Bas à ce jour. Dans les années 2007-2008, le Département de la Protection de l'Environnement de la Floride (*Florida Department of Environmental Protection*) a organisé des essais inter-laboratoires pour permettre aux laboratoires américains de vérifier la validité de leurs méthodes analytiques et de leurs résultats.

De façon plus ponctuelle, des comparaisons inter-laboratoires peuvent être réalisés afin de valider une méthode analytique ou observer l'influence de certaines méthodes (préparation de l'échantillon, extraction, lyse cellulaire, analyse) sur les résultats obtenus entre différents laboratoires.

Des comparaisons inter-laboratoires (MC-IC1 et MC-IC2) ont été menées par Metcalf et Codd (2005) à l'université d'Abo Akademi (Finlande) en 2003-2004 puis en 2005. La première phase de l'essai MC-IC1 se concentrait sur l'analyse quantitative des microcystines par HPLC-UV ainsi que sur leur récupération lors de l'étape de purification sur cartouches SPE. La seconde phase se concentrait davantage sur certains ajustements des protocoles standards établis afin d'améliorer la reproductibilité des résultats inter-laboratoires. L'étude comparative MC-IC2 avait pour objectif d'évaluer l'influence de certaines étapes de préparation (filtration, purification sur cartouche SPE, évaporation à sec, reconstitution) sur la récupération des toxines à l'aide d'ajouts dosés. Différents échantillons (biomasse cyanobactérienne lyophilisée, extraits de biomasse algale dissous dans l'eau avec deux niveaux de concentrations, et un échantillon de MC-LR purifié) ont été envoyés à huit laboratoires à travers l'Europe. Les Tableaux 5-36 et

5-37 présentent un exemple de résultats obtenus lors de l'étude comparative MC-IC2 concernant l'effet de la filtration ainsi que de l'étape de purification sur cartouche SPE.

Tableau 5.36 Concentrations en microcystines (MC-RR, MC-YR et MC-LR) mesurées dans l'échantillon de biomasse algale avec ou sans étape de filtration d'après l'étude comparative MC-IC2 (Metcalf et Codd 2005)

Microcystine	Filtration	Concentration en MC ($\mu g.g^{-1}$)	Ecart-type n=5 ($\mu g.g^{-1}$)
MC-RR	Non	321	15
	Oui	327	9
MC-YR	Non	171	10
	Oui	171	5
MC-LR	Non	292	12
	Oui	296	8

Tableau 5.37 Taux de récupération (en %) des microcystines obtenus pour des échantillons dopés d'eau en bouteille et d'eau du robinet d'après l'étude comparative MC-IC2 (Metcalf et Codd 2005)

	MC-RR		MC-YR		MC-LR	
Type d'échantillon	Récupération (%)	Ecart-type (n = 3)	Récupération (%)	Ecart-type (n = 3)	Récupération (%)	Ecart-type (n = 3)
Eau en bouteille	77,5	6,1	86,6	6,7	82,1	6,8
Eau du robinet	84,7	6,9	92,7	4,5	89,1	5,9

5.5.4 Accréditation

Afin de confirmer l'exactitude de leurs résultats, certains laboratoires sont accrédités (COFRAC en France, SANAS en Afrique du Sud, accréditation par le *National Accreditation Body of Greece* en Grèce, accréditation par le *Washington Department of Ecolog*y aux USA) en conformité avec les exigences de la norme ISO 17025 (*Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais*). Afin d'obtenir leurs accréditations, les laboratoires doivent fournir des protocoles bien définis concernant leurs niveaux de traçabilité, ainsi qu'un niveau de reproductibilité conforme aux exigences

de la norme ISO 17025. Dans la majorité des cas, les laboratoires accrédités doivent participerde façon régulière à des programmes de comparaisons inter-laboratoires, reconnus internationalement de préférence.

Les principaux éléments évalués lors de l'accréditation d'un laboratoire selon les exgences de la norme ISO 17025 sont :

1. La qualification du personnel;
2. La collecte des échantillons (si réalisé par le laboratoire);
3. La réception des échantillons (vérification de l'état des échantillons, critères d'acceptation, identification et stockage);
4. La documentation (protocoles analytiques, documents relatifs aux maintenances et aux étalonnages des appareils, à la calibration des appareils réalisée à chaque série d'analyse et des moyens de contrôle assurance qualité utilisés, manuel qualité);
5. La préparation des échantillons (filtration, lyse cellulaire/extraction, concentration/purification);
6. La détection, l'identification et la quantification (les compétences du technicien, les moyens de vérification utilisés, les maintenances et contrôles des appareils);
7. La transcription et l'exploitation des résultats (modes de calculs, vérification de l'identité de l'échantillon et de l'enregistrement du résultat et autorisation);
8. L'assurance contrôle de qualité (modes de contrôle de qualité et leur fréquence, les modes de vérification interne, les tests de compétence, les participations à des programmes de comparaison inter-laboratoires);
9. L'environnement de laboratoire et le maintien de la qualité de l'environnement de travail.

5.5.5 Formation du personnel

L'un des points importants mis en évidence dans le processus de validation et d'accréditation d'une méthode analytique est la qualification du personnel en charge de réaliser les analyses de cyanotoxines de manière routinière. Afin de s'assurer d'avoir du personnel de qualité pour la détection, l'dentification et la quantification des cyanotoxines, les laboratoires d'analyse peuvent se tourner vers des centres de formation spécialisés ou des centres gouvernementaux. D'après les réponses aux questionnaires obtenus et la revue de littérature réalisée par Codd et al. (2005), différents organismes proposant des formations de per sonnel pour la détection, l'identification et la quantification des cyanotoxines ont été

identifiés : Institute of Hydrobiology, National Institute for Environmental Studies, Tohoku University au Japon, Koeman en Bijkerk bv aux Pays-Bas, Thailand Institute of Scientific and Technological Research et Chiang Mai University en Thaïlande.

6 Synthèse et recommandations

Une coopération des différents acteurs est recommandée pour tout plan de surveillance des efflorescences de cyanobactéries afin de rassembler toutes les compétences nécessaires à un suivi efficace et rapide. La fréquence d'échantillonnage, ainsi que la période et la distribution spatiale des sites doivent être optimisées afin de ne pas manquer des informations cruciales à une gestion sécuritaire. Un seul site ou une seule date d'échantillonnage, n'est définitivement pas suffisant dans le cas des plans d'eau les plus à risque tels que les réservoirs d'eau potable et les zones de baignade très fréquentées. Cette étape peut être grandement améliorée en utilisant des techniques de détection rapides telles que les sondes submersibles ou la télédétection. La méthode d'échantillonnage à employer doit favoriser, dans la mesure du possible, l'intégration d'une certaine profondeur de la colonne d'eau, plus particulièrement l'épilimnion. Il est donc préférable de ne pas se limiter à un échantillon de surface. Les produits de conservation et fixateurs auront toujours l'inconvénient d'abimer les cellules cyanobactériennes, c'est pourquoi l'utilisation d'échantillons frais est préférable lorsque cela est possible, c'est-à-dire lorsque les échantillons peuvent être analysés dans un délai de 36 h maximum. Le Lugol est cependant un agent fixateur incontournable si l'on souhaite utiliser la technique Utermöhl. La technique de concentration la plus courante demeure la sédimentation, mais la technique de filtration est particulièrement avantageuse dans le cas des cyanobactéries car elle ne nécessite pas de fixation préalable, et ne devrait donc pas être négligée. L'utilisation de la microscopie selon la méthode Utermöhl est recommandée si l'on souhaite appliquer une méthode normalisée, cependant l'utilisation de cellules de comptage de type Nageotte sur échantillons frais est une bonne alternative si pour obtenir plus de précision dans l'identification.

L'identification des cyanobactéries nécessite de l'entrainement et beaucoup de temps et d'expérience. Cependant une formation sur l'identification des genres prédominants et des espèces potentiellement toxiques présentes dans une région donnée est recommandée dans un premier temps. La création d'une banque d'images de ces genres et espèces retrouvés dans la région d'étude est conseillée. L'utilisation de l'épifluorescence pour détecter les picocyanobactéries (tels que les genres *Aphanocapsa* et *Aphanothece)* est aussi fortement recommandée et déjà de plus en plus utilisée dans les laboratoires d'analyse interrogés. La cytométrie est une méthode prometteuse pour analyser une plus grande quantité d'échantillons dans un délai court, mais l'utilisation de cette méthode reste encore rare dans le cas de la surveillance d'efflorescences de cyanobactéries du fait de son manque de précision.

Cependant, les progrès techniques futurs devraient permettre d'optimiser cette approche et améliorer sa performance.

La validation des résultats et le contrôle qualité des analyses sont une garantie de résultats plus fiables, précis et comparables dans le temps et dans l'espace. Ce document propose différentes étapes de validation et de contrôle qualité qui devraient être appliquées le plus sérieusement possible selon les moyens techniques et financiers du laboratoire. De plus, un bon moyen de tester les aptitudes d'identification et de dénombrement des cyanobactéries au microscope est la participation à des tests inter-laboratoires accrédités. Ce type de test n'est pas pratiqué par une part importante des laboratoires interrogés mais les laboratoires australiens devraient être pris en exemple (par ex. NATA). Enfin, une bonne coopération internationale dans la création de méthodes normalisées pour l'échantillonnage et le calcul du biovolume des cyanobactéries devrait être entreprise.

La détection, l'identification et la quantification des differents types et variantes de cyanotoxines nécessitent l'application de techniques analytiques complexes et variées, de l'entrainement pour le personnel en charge et beaucoup de temps. De nos jours, un nombre important de méthodes analytiques sont actuellement utilisées dans les différents laboratoires, à travers le monde afin de détecter la présence de l'anatoxine-a, des cylindrospermospines, des microcystines, des nodularines et des saxitoxines alors qu'un nombre très restreint de laboratoires réalisent à l'heure actuelle l'analyse de la BMAA et des dermatotoxines de manière routinière en raison de leur découverte relativement récente et du manque de méthodes analytiques fiables.

Afin d'assurer une bonne gestion des plans d'eau et des stations de traitement de l'eau potable, il est recommandé de mesurer les concentrations en toxines intra- et extra-cellulaires. Pour ce faire, une étape de séparation liquide/solide par filtration est requise. Pour déterminer la teneur en toxines intra-cellulaires, les techniques de lyse cellulaire les plus utilisées sont les cycles de congélation-décongélation et l'ultrasonication, suivi par une extraction en présence de solvants sélectionnés en fonction de la toxine ciblée. Des études récentes soulignent qu'une portion non négligeable des microcystines pourrait être liée aux protéines, rendant leur extraction difficile avec les techniques disponibles actuellement et entraînant un risque de sous-estimation des concentrations. Afin de déterminer la teneur en toxines extra-cellulaires, les laboratoires d'analyse réalisent généralement une purification et concentration sur cartouche SPE.

Une fois les échantillons préparés, les techniques de dosage des toxines les plus utilisées sont les tests immunologiques ELISA (majoritairement fournis par les compagnies Abraxis et Envirologix) et les

méthodes chromatographiques (HPLC-UV et LC/MS). Certaines études comparatives recommandent une d'utiliser dans un premier temps les méthodes immunologiques ELISA plus rapides pour détecter la présence de toxines, suivie d'une confirmation des résultats positifs (100%) et d'une proportion des résultats négatifs (10%) à l'aide de méthodes chromatographiques plus robustes. Cette approche permet de réduire le nombre d'échantillons nécessitant une investigation analytique complète et par conséquent la charge de travail pour le laboratoire d'analyse. De plus, elle permet de prendre des décisions temporaires plus rapidement lorsque les toxines sont détectées à des niveaux proches des seuils décisionnels, décisions qui pourront être confirmées ou infirmées plus tard.

Encore une fois, afin d'assurer une gestion efficace et sécuritaire des eaux récréatives ou de consommation, il est important que les laboratoires d'analyse puissent certifier leurs résultats. Plusieurs moyens de vérification et de certification des résultats sont proposés dans ce rapport. Les moyens les plus utilisés par les laboratoires sont généralement l'analyse de blancs de laboratoire, la calibration des appareils analytiques à l'aide de solution standards certifiées (lorsque disponible sur le marché), l'analyse d'ajouts dosés, et les analyses en duplicats ou en réplicats. Lorsque possible, les laboratoires peuvent participer à des programmes de comparaisons inter-laboratoire afin de confirmer ou infirmer l'exactitude de leurs résultats analytiques. Ce type de programmes n'est cependant pas accessible dans tous les pays. Les organisateurs Européens de comparaison inter-laboratoire pour l'analyse des toxines devraient être pris en exemple.

Références bibliographiques

Afssa & Afsset. 2006. Risques sanitaires liés à la présence de cyanobactéries dans l'eau – Risques sanitaires liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives. Rapport commun de l'Afssa et de l'Afsset, France, 242 p.

Agawin, N., Duarte, C. & Agustí, S. 2000. Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnology and Oceanography*, 45: 591–600.

Aguete, E.C., Martínez, A.G., Leão, J.M., Rodríguez-Vásquez, J.A., Menàrd, C. & Lawrence, J.F. 2003. HPLC and HPCE analysis of microcystins RR, LR and YR present in cyanobacteria and water by using immunoaffinity extraction. *Talanta*, 59: 697-705.

Ahn, Y.H. & Shanmugam, P. 2006. Detecting the red tide algal blooms from satellite ocean colour observations in optically complex Nourtheast-Asia coastal waters. *Remote Sens. Environ*., 103: 419–437.

Almesjö, L. & Rolff, C. 2007. Automated measurements of filamentous cyanobacteria by digital image analysis. *Limnology and Oceanography: Methods,* 5: 217-224.

Antoine, M. 2009. Analyse et gestion du risque cyanobactéries/cyanotoxines dans les eaux de baignades et les eaux destinées à la consommation humaine du département de la Haute-Vienne. Mémoire de l'école des Hautes Études en santé publique, Limousin, France, 90p.

AOAC. 2010. Official Method 959.08 : Paralytic Shellfish Poison – Biological Method. *Journal of AOAC International*, 49: 86-88.

AOAC. 2005. AOAC Official Method 2005.06 : Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish – Prechromatorgaphic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of AOAC International*, 49: 89-102.

APEL. 2009. Étude limnologique du haut-bassin de la rivière Saint-Charles. Association pour la Protection de l'Environnement du lac Saint-Charles et des Marais du Nord, Canada, Québec, 354p.

Aranda-Rodriguez, R. & Jin, Z. 2011. Evaluation of field test kits to detect microcystins: 2010 study. Rapport préparé pour Exposure and Biomonitoring Division Health Canada, Canada, 21 p.

Bazin, H. 2013. Validation de méthodes analytiques. Disponible à l'adresse internet suivante : http://www.bazin-conseil.fr/valid.html. Consulté le 14 septembre 2013.

Becker, R.H., Sultan, M.I., Boyer, G.L., Twiss, M.R. & Konopko, E. 2009. Mapping cyanobacterial blooms in the great lakes using modis. *J. Great Lakes Res.* 35, 447-453.

Bell, T. & Kalf, J. 2001. The contribution of picophytoplankton in marine and freshwater systems of different trophic status and depth. *Limnology and Oceanography*, 46: 1243–1248.

Belzile, C., Vincent, W.F., Howard-Williams, C., Hawes, I., James, M.R., Kumagai, M. & Roesler, C.S. 2004. Relationships between spectral optical properties and optically active substances in a clear oligotrophic lake. *Water Resources Research*, 40: W12512.

Beutler, M., Wiltshire, K.H., Meyer, B., Modalenje, C., Lürling, C., Meyerhöfer, M., Hansen, U.P. & Dau, H. 2002. A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ. *Photosynthesis Research* 72: 39-53.

Binding, C. E., Greenberg T.A & Bukata, R.P. 2011. Time Series Analysis of Algal Blooms in Lake of the Woods Using MERIS Maximum Chlorophyll Index. *Journal of Plankton Research,* 100: 13321–13332.

Birk, S., Strackbein, J. & Hering, D. 2010. WISER methods database. Disponible à l'adresse internet: http://www.wiser.eu/results/method-database/.

Blue Green Algae Work Group. 2010. Cyanobacteria in California Recreational Water Bodies: Providing Voluntary Guidance about Harmful Algal Blooms, Their Monitoring, and Public Notification. Draft report, 42p.

Bogialli, S., Bruno, A., Curini, R., Fanalli, C. & Laganà, A. 2006. Monitoring Algal Toxins in Lake Water by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Environmental Science and Technology*, 40: 2917-2923.

Bonilla, S. 2009. Cianobacterias Planctónicas del Uruguay: Manual para la identificación y medidas de gestión, Documento Técnico PHI Nº 16, ISBN 978-92-9089-138-3, Uruguay, 105 p.

Bownik, A. 2010. Harmful algae: effects of alkaloid cyanotoxins on animal and human health. *Toxin Reviews*, 29(3-4): 99-114.

Box, J. D. 1981. Enumeration of cell concentrations in suspensions of colonial freshwater microalgae, with particular reference to *Microcystis aeruginosa*. *Brittain Phycoly Journal,* 16: 153-164.

Brient, L., Legeas, M., Leitao, M., Peigner, P., Goraguer ,M.A. & Mansotte, F. 2004. Étude interrégionale Grand Ouest sur les cyanobactéries en eau douce. Ministère chargé de la Santé de la Famille et des Personnes Handicapées, France, 82p.

Brient L., Lengronne M., Bertrand E., Rolland D.C., Sipel A., Steinmann D., Baudin I., Legeas, M. Le Rouzic, B. & Bormans M. 2008. A phycocyanin probe as a tool for monitoring cyanobacteria in freshwater bodies. *Journal of Environmental Monitoring*, 10: 248-255.

Bryant, D. A. 1991. Cyanobacterial phycobilisomes: progress toward complete structural and functional analysis via molecular genetics. In L. Bogorad, & I. K. Vasil (Eds.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants, vol 7B.*: 255-298.

Brylinsky, M. 2012. Evaluation of two test kits for measurement of microcystin concentrations. Rapport préparé pour Nova Scotia Department of the Environment, Canada, 19 p.

Burch, M.D. 2008. Effective doses, guidelines & regulations. *Advanced in experimental medicine and biology*, 619: 831-853.

Callieri, C. 2007. Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Reviews*, 1: 1–28.

Carmichael, W. W., Azevedo, S. M. F. O. & Eaglasham, G. K. 2001. Human fatalities from cyanobacteria; chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, 109: 663-668.

Casamatta, D. 2006. Assessment of the Public Health Risk from Cyanobacteria and their Related Toxins in Surface Water of the St. Johns River Utilized for Recreational Activities. University of North Florida, Jacksonville, Floride, 34p.

CEAEQ. 2012. Identification, dénombrement et estimation du biovolume des cyanobactéries et des algues – MA.800 – Cya.alg 1.0. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Canada, 22 p.

CEAEQ. 2012. Dépistage des cyanobactéries – MA.800 – Cya.dep 1.0. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Canada, 16 p.

CEAEQ. 2009. Protocole pour la validation d'une method d'analyse en chimie. DR-12-VMC. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Canada, 30 p.

Cellamare, M., Rolland, A. & Jacquet, S. 2010. Flow cytometry sorting of freshwater phytoplankton. *Journal of Applied Phycology*, 22: 87-100.

CEN. 2006. Qualité de l'eau - Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode Utermöhl) - NF EN 15204, Centre Européen de Normalisation, ISSN 0335-3931, 43 p.

Chorus, I. 2012. Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Federal Environment Agency (Umweltbundesamt), Dessau-Roßlau, Allemagne, ISSN 1862-4804, 151p.

Chorus, I. & Bartram, J. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organisation, Londres UK et New-York USA, ISBN 0-419-23930-8, 400p.

Codd, G. A., Morrison, L. F. & Metcalf, J. S. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 264-272.

Codd, A., Chorus I. & Burche, M. 1999. Design of monitoring programms – Chapter 10. In: Chorus I. & Bartram J. (eds). *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. World Health Organisation, Londres, United Kingdom, 400p.

Congestri, R., Federici, R. & Albertano, P. 2000 Evaluating biomass of Baltic filamentous cyanobacteria by image analysis. *Aquatic and Microbial Ecology,* 22: 283-290.

Costa, P.R., Baugh, K.A. Wright, B., RaLonde, R., Nance, S.L., Tatarenkova, N., Etheridge, S.M. & Lefebvre, K.A. Comparative determination of paralytic shellfish toxins (PSTs) using five different toxin detection methods in shellfish species collected in the Aleutian Islands, Alaska. *Toxicon,* 54: 313–320.

CRC WQT. Cyanobacteria – Management and implcations for water quality. The cooperative research centre for water quality and treatment, 36p.

Culverhouse, P. F., Williams, R., Benfield, M., Flood, P. R., Sell, A. F., Mazzocchi, M. G., Buttino, I. & Sieracki, M. 2006. Automatic image analysis of plankton: future perspectives. *Marine Ecology Progress Series,* 312: 297-309.

Cusick, K.D. & Sayler, G.S. 2013. An Overview on the Marine Neurotoxin, Saxitoxin: Genetics, Molecular Targets, Methods of Detection and Ecological Functions – Review. Marine Drugs, 11, 991-1018.

Deblois, C.P., Mochon, A. & Juneau, P. 2008. Toxines de cyanobactéries dans les perchaudes : analyse exploratoire dans quatre lacs du bassin de la rivière Yamaska. *Le Naturaliste Canadien*, 132, 56-59.

Dekker, A. G., Malthus T.J. & Goddijn, L.M. 1992. Monitoring cyanobacteria in eutrophic waters using airborne imaging spectroscopy and multispectral remote sensing systems. *Proceedings of Sixth Australian Remote Sensing Conference* Vol.1.

Dekker, A. G. 1993. Detection of optical water quality parameters for eutrophic waters by high resolution remote sensing. Ph. D. thesis. Vrije University, Amsterdam.

Descy, J. P., Pirlot, S., Verniers, G., Lara, Y., Wilmotte, A., Vyverman, W., Vanormelingen, P., Van Wichelen, J., Gremberche, I. V., Triest, L., Peretyatko, A., Everbecq, E. & Cood, G.A. Cyanobacterial blooms : toxicity, diversity, modelling and management "B-Blooms 2". Final Report Phase 1. Belgian Science Policy 2009 – Bruxelles, Belgique 59 p.

Dodds, W. K., Bouska, W. W., Eitzmann, J. L., Pilger, T. J., Pitts, K. L., Riley, A. J., Schloesser, J. T. & Thornbrugh, D. J. 2008. Eutrophication of U.S. freshwaters: analysis of potential economic damages. *Environmental Science & Technology*, 43(1): 12-19.

Dokulil, M. T. & Teubner, K. 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, 438(1): 1-12.

Dorion, I., Néron, S., Blais, S. & Sinotte M. 2013. Protocole d'observations et d'échantillonnage pour les plans d'eau. Ministère du Dévellopement Durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs, Québec, 37 p.

Druart, J.C. & Rimet, F. 2008. Protocoles d'analyse de phytoplankton de l'INRA: Prélèvement, dénombrement et biovolumes. INRA Thonon-les-bains, 97p.

Dubelaar, G.B.J., Gerritzen, P.L., Beeker, A.E.R., Jonker R.R. & Tangen, K. 1999. Design and first results of the CYTO-BUOY: an automonous flow cytomètre with wireless data-transfer for in situ analysis of marine and freshwater. *Cytometry*, 37: 247-254.

Dubelaar, G.B.J. & Gerritzen, P.L. 2000. CytoBuoy: a step forward towards using flow cytométrie in operational oceanography. *Scientia Marina*, 64 (2): 255-265.

Dubelaar, G. B. J. & Geerders, P. J. F. 2004. Innovative technologies to monitor plankton dynamics scanning flow cytometry: A new dimension in real-time, in-situ water quality monitoring. *Sea Technology*, 2004: 15–21.

Dunagan, S., Baldauf, B., Finch, P., Guild, L., Hochberg, E., Jaroux, B., Johnson, L., Ryan, J.,Sandor-Leahy, S. & Shepanski, J.2009. Small satellite and UAS assets for coral reef and algal bloom monitoring. Proceedings, 33rd International Symposium on remote sensing of environment, IRSE 2009, 837-841.

Dupuis, A. P. & Hann, B. J. 2009. Warm spring and summer water temperatures in small eutrophic lakes of the Canadian prairies: potential implications for phytoplankton and zooplankton. *Journal of Plankton Research*, 31(5): 489-502.

Elder, L. & Elbrächter, M. 2010. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. In: Karlson, B., Cusack, C., & Bresnau (eds). *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis.* Organisation des Nations Unies pour l'Éducation, la Science et la Culture (UNESCO), Paris, France (IOC Manuals and guides, n° 55), 110p.

El-Alem, A., Chokmani, K., Laurion, I. & El-Adlouni, S.E. 2012. Comparative Analysis of Four Models to Estimate Chlorophyll-a Concentration in Case-2 Waters Using Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS) Imagery. *Remote Sensing*, 4(8): 2373-2400.

Esterhuizen-Londt, M. & Downing, T.G. 2011. Solid phase extraction of β-N-methylamino-L-alanine (BMAA) from South African water supplies. *Water SA*, 37(4): 523-528.

Esterhuizen-Londt, M. & Downing, T.G. 2009. b-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 309– 313.

EURLMB. 2010. Report of the EURLMB 2010 proficiency testing on saxitoxin group (PSP) toxins determination. *European Union reference laboratory for marine biotoxins*, Espagne, 39 p.

Fastner, J., Cood, G. A., Metcalf, J.S., Woitke, P. Wiedner, C. & Utkilen, H. 2002. An international intercomparison exercise for the determination of purified microcystin-LR and microcystins in cyanobacterial field material. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374: 437–444.

Gitelson, A.A., Schalles, J.F. & Hladik, C.M. 2007. Remote chlorophyll-a retrieval in turbid, productive estuaries: Chesapeake bay case study. *Remote Sens. Environ.* 109, 464-472.

Goel, R. & Myers, L. 2009. Evaluation of cyanotoxins in the Farmington Bay, Great Salt Lake, Utah. Project report, USA, 39 p.

Graham, J.L., Loftin, K.A. & Kamman, N. 2009. Monitoring Recreational Freshwaters. *Lakeline, Summer 2009*, 18-24.

Graham, J.L., Loftin, K.A., Ziegler, A.C. & Meyer, M.T. 2008. Guidelines for design and sampling for cyanobacterial toxin and taste-and-odor studies in lakes and reservoirs. *U.S. Geological Survey Scientific Investigations* Report 2008–5038, 39 p.

Graham, J. L. 2006. Harmful algal blooms. *U.S. Geological Survey (USGS) Fact Sheet*, 2006-3147.

Grossman, A., Bhaya, D., Apt, K. & Kehoe, D. 1995. Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: Diversity, control, and evolution. *Annual Review of Genetics*, 29: 231-287.

Hall, S. 1999. Volunteer phytoplankton program. In: J.L. Martin, & K. Haya (eds). *Proceedings of the Sixth Canadian Workshop on Harmful Marine Algae*. Canadian Technical Reports for Fishering and Aquatic Sciences 2261, 30p.

Hallegraeff, G. M. 1977. A comparison of different methods used for the quantitative evaluation of biomass of freshwater phytoplankton. *Hydrobiologia,* 55:145–65.

Hardy, J. 2008. Washington State Recreational Guidance for Microcystins (Provisional) and Anatoxin-a (Interim/Provisional). Final Report for the Washington State Department of the Health, USA, 25 p.

Hayat, M.A. 2000. Principles and techniques of electron microscopy : Biological applications. 4th Ed. Academic Press, 543 p.

Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollingher, U. & Zohary, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35: 403-424.

Hobro, R. & Willen, E. 1977. Phytoplankton countings: intercalibration results and recommendations for routine work. *Internationale Revue Gesamten Hydrobiologie*, 62:805–11.

Hötzel, G. & Croome, R. 1999. A phytoplankton methods manual for Australian Freshwaters. Canberra (Australia): Land and Water Resources Research and Development Corporation, 66p.

Huisman, J., Matthijs, H.C.P. & Visser, P.M. 2005. *Harmful cyanobacteria*. Dordrecht, Netherlands: Springer.

Hunter, P.D., Tyler, A.N., Carvalho, L., Codd, G.A. & Maberly S.C. 2010. Hyperspectral remote sensing of cyanobacterial pigments as indicators for cell populations and toxins in eutrophic lakes. *Remote sensing of Environment*, 114: 2705-2718.

ISO. 2005. Water quality — Determination of microcystins — Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection - Qualité de l'eau — Dosage des microcystines — Méthode utilisant l'extraction en phase solide (SPE) et la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec détection dans l'ultraviolet (UV). International standard, n° référence : 20179:2005(E), Genève, Suisse, 24p.

ISSC. 2010. Saxitoxin (PSP) ELISA Kit. Section IV. Guidance Documents, Chapter II Growing Areas, .10 Approved National Shellfish Sanitation Program Laboratory Tests: Microbiological and Biotoxin Analytical Methods, Proposal 09-107. 262-274.

Istvanovics, V. 2009. Eutrophication of lakes and reservoirs. In G. E. Likens (ed.), *Encyclopedia of Inland Waters*. Oxford: Academic Press. p. 165-175.

Izaguirre, G., Hwang, C. J., Krasner, S. W. & McGuire, M. J. 1982. Geosmin and 2-Methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply systems. *Applied Environmental Microbiology*, 43(3): 708-714.

Jacques, G. 1978. Phytoplancton: biomasse, production, numération et culture. Laboratoire Arago, Université Pierre et Marie Curie, 107p.

James, R., Gregg, A., Battelle, D. & McKernan, J. 2011. Environmental Technology Verification Report ETV Advanced Monitoring Systems Center ZEU-INMUNOTEC, S.L. MICROCYSTIN TEST KIT: MICROCYSTEST, USA, 49 p.

James, K.J., Ambrose, F., Sherlock, I.R., Stack, M.A., Twohig, M., Caudwell, F.B. & Skulberg, O.M. 1998. Sensitive detremination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorometric detection. *Journal of chromatography A*, 147-157.

Johnson, K.M. 1999. Microcystins in components of twelve New Hampshire lakes of varied trophic status. UNH Center for Freshwater Biology Research, 1 (4) : 45-56.

Jupp, D. L. B., Kirk J.T.O. & Harris G.P. 1994. Detection, identification and mapping of cyanobacteria using remote sensing to measure the optical quality of turbid inland waters. *Australian Journal of Marine Freshwater Research*, 45: 801-828.

Juttner, F. & Watson, S. B. 2007. Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. *Applied Environmental Microbiology*, 73: 4395-4406.

Jupp, D. L. B., Kirk J.T.O. & Harris G.P. 1994. Detection, identification and mapping of cyanobacteria using remote sensing to measure the optical quality of turbid inland waters. *Australian Journal of Marine Freshwater Research*, 45: 801-828.

Kanz, R.J. 2008. Final Report to the U.S. Environmental Protection Agency on Cyanotoxin Accumulation in Fish and Freshwater Mussels of the Klamath River. Water Quality Cooperative Agreement CP 96941301-2, 57 p.

Karlson, B., Cusack, C. & Bresnau, E. 2010. Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Organisation des Nations Unies pour l'Éducation, la Science et la Culture (UNESCO), Paris, France (IOC Manuals and guides, n° 55), 110p.

Kasich, J.R., Taylor, M., Nally, S.J., Zehringer, J. & Wymyslo, T.E. 2012. State of Ohio Harmful Algal Bloom Response Strategy For Recreational Waters. *Department of Health, Environmental Protection Agency and Department of Natural Resources* Report. 48 p.

Khlil, N. 2011. État des lieux des microcystines (MCs) dans les eaux alimentant le Grand Casablanca et état de l'art de l'optimisation de l'élimination de la MCLR, par chlorination, en utilisant la Méthodologie de Surface de Réponse(RSM). Mémoire de thèse de l'université de Casablanca, Casablanca, Maroc, 108p.

Kimmerer, W.J. & McKinnon, A.D. 1986. Glutaraldehyde fixation to maintain biomass of preserved plankton. *Journal of Plankton Research,* 8: 1003-1008.

Kruk, C., Vidal, L., Aubriot, L., Bonilla, S. & Brena B. 2009. Metodologias de análisis de cuanobacterias. In : S. Bonilla (ed.). *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión.* UNESCO, Documento Técnico PHI-LAC, N° 16.

Kubo, T., Kato, N., Hosoya, K. & Kaya, K. 2008. Effective determination method for a cyanobacterial neurotoxin, b-N-methylamino-L-alanine. *Toxicon*, 51: 1264-1268.

Kutser, T. 2004. Quantitative detection of chlorophyll in cyanobacterial blooms by satellite remote sensing. *Limnology and Oceanography* , 49: 2179-2189.

Kutser, T., Metsamaa L., Strömbeck N. & Vahtmäe, E. 2006. Monitoring cyanobacterial blooms by satellite remote sensing. *Estuarine, Coastal and Shelf Sciences,* 67: 303-312.

Laplace-Treyture, C., Barbe, J., Dutartre, A., Druart, J. C., Rimet, F. & Anneville, O. 2009. Protocole standardisé d'échantillonnage, de conservation, d'observation et de dénombrement du phytoplancton en plan d'eau pour la mise en oeuvre de la DCE: version 3.3.1. Convention de partenariat avec l'ONEMA,France, 19 p.

Lavender, S.J. & Groom, S.B. 2001. The detection and mapping of algal blooms from space. *International Journal of Remote Sensing*, 22(2-3): 197-201.

Lavoie, I., Laurion I., Warren A. & Vincent, W.F. (2007) Les fleurs d'eau de cyanobactéries, revue de littérature. Rapport de recherche no 916, INRS - Centre Eau Terre Environnement, Québec, Canada, 124 p.

Lawrence, J.F., Niedzwaden, B. & Menard, C. 2005. Quantitative Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish Using Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88 (6): 1714-1732.

Lawton, L. A. & Edwards, C. 2001. Review: Purification of microcystins. *Journal of Chromatography A*, 912: 191–209.

Lawton, L. A., Marsalek, B., Padisák, J. & Chorus, I. 1999. Determination of cyanobacteria in the laboratory - Chapter 12. . In I. Chorus, & J. Bartram (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.* World Health Organization (WHO).

Ledoux, M. & Hall, S. 2000. Proficiency Testing of Eight French Laboratories in Using the AOAC Mouse Bioassay for Paralytic Shellfish Poisoning: Interlaboratory Collaborative Study. Journal of AOAC International, 83(2), 305-310.

Leitao, M.& Couté, A. 2005. Guide pratique des cyanobactéries planctoniques du Grand-Ouest de la France – manuel pour les prélèvements et la reconnaissance à l'usage des gestionnaires des eaux de surfaces, caractéristiques, échantillonnage, identification, France, ISBN 2-9523536-0-3, 34 p.

Legresley, M. & Mcdermott, G. 2010. Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis - haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. In: Karlson, B., Cusack, C., Bresnan, E. (Eds.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. UNESCO (IOC Manuals and Guides, nº 55.), Paris: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, p. 25-30.

Leppänen, J.-M., Rantajärvi E., Hällfors, S., Kruskopf, M. & Laine, V. 1995. Unattended monitoring of potentially toxic phytoplankton species in the Baltic Sea in 1993. *Journal of Plankton Research*, 17:891-902.

Li, A., Tian, Z., Li, J., Yu, R., Banack, S.A. & Wang, Z. 2010. Detection of the neurotoxin BMAA within cyanobacteria isolated from freshwater in China. Toxicon, 55: 947–953.

Lindholm, T. & Meriluoto, J.A.O. 1991 Recurrent depth maxima of the hepatotoxic cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. Canadian Journal of Fishering and Aquatic Sciences, 48: 1629-1634.

Loftin, K.A., Meyer, M.T., Rubio, F., Kamp, L., Humphries, E. & Whereat, E. 2008. Comparison of two cell lysis procedures for recovery of microcystins in water samples from Silver Lake in Dover, Delaware with microcystin producing cyanobacterial accumulations. *USGS Open-File Report* 2008-1341, 9 p.

Lund, J.W.G. 1951. A sedimentation technique for counting algae and other organisms. *Hydrobiologia,* 3: 390-394.

Lürling, M., Eshetu, F., Faassen, E.J., Kosten, S.& Huszar, V.L.M. 2013. Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biology*, 58(3): 552-559.

McCully M.E., Goff ,L.J. & Adshead, P.C. 1980. Preparation of algae for light microscopy. In: E. Gantt (ed). *Developmental and cytological methods. Handbook of phycological methods*, Cambridge University Press, Cambridge, 420p.

McQuaid, N., Zamyadi, A., Prévost, M., Bird, D. F. & Dorner, S. 2011. Use of in *vivo* phycocyanin fluorescence to monitor potential microcystin-producing cyanobacterial biovolume in a drinking water source. *Journal of Environmental Monitoring*, 13: 455-463.

MDDEP. 2012. Liste des plans d'eau touchés par une fleur d'eau d'algues bleu-vert de 2004 à 2012. Ministère du Dévellopement Durable de l'Environnement et des Parcs, 21 p. Document disponible à l'adresse : http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/algues-bv/bilan/liste-plansdeau-touches-abv2004-2012.pdf

Menden-Deuer, S. & Lessard, E.J. 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnology and Oceanography*, 45: 569–579.

Meriluoto J.A.O. & Codd, G.A. 2005. Toxic Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxins Analysis, *Acta Academiaee Aboensis*, 65(1): 1-151.

Meriluoto J.A.O. & Spoof, L. E.M. 2008. Chapter 21: Cyanotoxins: sampling, sample processing and toxin uptake. In Hundel H. K. (Ed.), *Cyanobacterial harmful algal blooms – State of the science and research needs*, Springer, 483-499.

Meriluoto J.A.O. & Spoof, L. E.M. 2005a. SOP: Extraction of anatoxin-a or cylindrospermopsin from cyanobacterial biomass filtered on glass-fibre filters. SOP_TOXIC_UDU_ 06F. In Meriluoto J. & Cood, G.A. (Ed.), *Toxic Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxins Analysis*, Acta Academiaee Aboensis, 65(1): 123-124.

Meriluoto J.A.O. & Spoof, L. E.M. 2005b. SOP: Extraction of microcystin in biomass filtered on glass-fibre filters or in freeze-dried cyanobacterial biomass. SOP_TOXIC_AAU_ 04F. In Meriluoto J. & Cood, G.A. (Ed.), *Toxic Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxins Analysis*, Acta Academiaee Aboensis, 65(1): 69-72.

Meriluoto J.A.O. & Spoof, L. E.M. 2005c. SOP: Solid phase extraction of microcystins in water samples. SOP_TOXIC_AAU_ 05F. In Meriluoto J. & Cood, G.A. (Ed.), *Toxic Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxins Analysis*, Acta Academiaee Aboensis, 65(1): 69-72

Metcalf, J.S. & Codd, G.A. 2005a. SOP: Laboratory analysis of samples from environmental waters. SOP_TOXIC_UDU_02F. In Meriluoto J. & Cood, G.A. (Ed.), *Toxic Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxins Analysis*, Acta Academiaee Aboensis, 65(1): 113-116.

Metcalf, J.S. & Codd, G.A. 2005b. SOP: Solid phase extraction of anatoxin-a in filtered water samples. SOP_TOXIC_UDU_04F. In Meriluoto J. & Cood, G.A. (Ed.), *Toxic Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxins Analysis*, Acta Academiaee Aboensis, 65(1): 119-120.

Metcalf, J.S. & Codd, G.A. 2005c. SOP: Solid phase extraction of cylindrospermopsin in filtered water samples. SOP_TOXIC_UDU_05F. In Meriluoto J. & Cood, G.A. (Ed.), *Toxic Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxins Analysis*, Acta Academiaee Aboensis, 65(1): 121-123.

Metcalf, J.S. & Codd, G.A. 2005d. SOP: Analysis of anatoxin-a by high liquid chromatography with photodiode-array detectoin. SOP_TOXIC_UDU_08F. In Meriluoto J. & Cood, G.A. (Ed.), *Toxic Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxins Analysis*, Acta Academiaee Aboensis, 65(1): 129-132.

Metcalf, J.S. & Codd, G.A. 2005e. SOP: Analysis of cylindrospermopsine by high liquid chromatography with photodiode-array detectoin. SOP_TOXIC_UDU_09F. In Meriluoto J. & Cood, G.A. (Ed.), *Toxic Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxins Analysis*, Acta Academiaee Aboensis, 65(1): 133-136.

Metsamaa, L., Kutser T. &, Strömbeck, N. 2006. Recognising cyanobacterial blooms based on their optical signature. *Boreal Environmental Research*, 11:493-506.

Mischke, U., Thackeray, S., Dunbar, M., Mcdonald, C., Carvalho, L., De Hoyos, C., Jarvinen, M., Laplace-Treyture, C., Morabito, G., Skjelbred, B., Solheim, L., Brierley, B. & Dudley, B. 2012. Deliverable D3.1-4: Guidance document on sampling, analysis and counting standards for phytoplankton in lakes. WISER, Seventh framework programme, 50p.

Montagnes, D.J.S., Berges, J.A., Harrison, P.J. & Taylor, F.J.R. 1994. Estimating carbon, nitrogen, protein, and chlorophyll a from volume in marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 39:1044–60.

Morral, J., Cao, J., Heresztyn, T., Chandrasena, N. & Nicholson, B.C. 2001. Comparison of methods for the determination of peptode hepatotoxins (microcystins). Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment, Research Report N°10, Australia, 64 p.

Msagati, T.A.M., Siame, B.A. & Shushu, D.D. 2006. Review - Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology*, 78: 382–397.

Negri, A.P., Jones, G.J., Blackburn, S.I., Oshima, Y. & Onoha, H. 1997. Effect of culture and bloom development and of sample storage on paralytic shellfish poisons in the cyanobactefuum, Anabaena Circinalis. J. Phyrol, 33: 26-35.

Newcombe, G. 2009. International Guidance Manual for the Management of toxic cyanobacteria. Global Water Research Coalition, London, United Kingdom, 414p.

NF_EN_15204. 2006. Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode Utermöhl).

NHMRC. 2004. AUSTRALIAN DRINKING WATER GUIDELINES 6 - National Water Quality Management Strategy, National Health and Medical Research Council, ISBN Online: 1864961244, 615 p.

Nicholson, B., Papageorgiou, J., Humpage, A., Steffensen, D., Monis, P., Linke, T., Fanok, S., Shaw, G., Eaglesham, G., Davis, B., Wickramasinghe, W., Stewart, I., Carmichael, W., & Servaites, J**.** 2007. Determination and Significance of Emerging Algal Toxins (Cyanotoxins). AwwaRF Report 91170, 172 p.

Nicholson, B.C. & Burch, M.D. 2001. Evaluation of Analytical Methods for Detection and Quantification of Cyanotoxins in Relation to Australian Drinking Water Guidelines. Report prepared for the National Health and Medical Research Council of Australia, the Water Services Association of Australia, and the Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment, Australia, 64 p.

Nõges P., Poikane, S., Toomas Kõiv, T. & Nõges, T. 2010. Effect of chlorophyll sampling design on water quality assessment in thermally stratified lakes. *Hydrobiologia*, 649:157-170.

Olenina, I., Hajdu, S., Edler, L., Andersson, A., Wasmund, N., Busch, S., Göbel, J., Gromisz, S., Huseby, S., Huttunen, M., Jaanus, A., Kokkonen, P., Ledaine, I. & Niemkiewicz, E. 2006. Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea. HELCOM Baltic Sea Environmental Proceedings No. 106, 144p.

Oliver, R.L. & Ganf, G.G. 2000. Freshwater blooms. In W. B. A., & M. Potts (Eds.), *Ecology of cyanobacteria- their diversity in time and space*, Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publisher.

O'Sullivan, P.E. 1995. Eutrophication. *International Journal of Environmental Studies*, 47: 173:195.

Paerl, H.W. & Huisman, J. 2008. Blooms like it hot. *Science*, 320: 57-58.

Paerl, H.W., Fulton, R.S., Moisander, P.H. & Dyble, J. 2001. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *The scientific world*, 1: 76-113.

Pelletier, J.P. & Orand, A. 1978. Appareil de prélèvement d'un échantillon dans un fluide. Brevet d'invention 76.08579.

Poulton, N.J. & Martin, J. 2010. Imaging flow cytometry for quantitative phytoplankton analysis — FlowCAM. In: Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, no. 55.) (IOC/2010/MG/55), 110 pages.

Queensland Government – Natural Resources and Water. 2008. Water Monitoring: Monitoring Standard for Freshwater Blue-Green algae.

Randolph, K.L. 2007. Remote Sensing of Cyanobacteria in Case II Waters Using Optically Active Pigments, Chlorophyll a and Phycocyanin. Ph. D. Thesis, Indiana University, Purdue,USA.

Randolph, K., Wilson, J., Tedesco, L., Li, L., Pascual, D.L. & Soyeux, E. 2008. Hyperspectral remote sensing of cyanobacteria in turbid productive water using optically active pigments, chlorophyll a and phycocyanin. *Remote sensing of Environment,* 112: 4009-4019.

Rantajärvi, E., Olsonen R., Hällfors S., Leppänen J.M.& Raateoja, M. 1998. Effect of sampling frequency on detection of natural variability in phytoplankton: unattended hight-frequency measurements on board ferries in the Baltic Sea. *ICES Journal of Marine Science,* 55:697-704.

Rawn, D.F.K., Lau, B.P.Y., Niedzwiadek, B. & Lawrence, J.F. 2005. Improved Method for the Determination of Anatoxin-a and Two of Its Metabolites in Blue-Green Algae Using Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of AOAC International*, 88 (6): 1741-1747.

Reynolds, C.S. & Jaworski ,G.H.M. 1978. Enumeration of natural *Microcystis* populations. *British Phycoly Journal,* 13: 269-277.

Rolland, D.C., Bourget, S., Warren, A., Laurion, I. & Vincent, W.F. 2013. Extreme variability of cyanobacterial blooms in an urban drinking water supply. *Journal of Plankton Research*, 35:744-758.

Rosen, B.H., Loftin, K.A., Smith, C.E., Lane, R.F. & Keydel, S.P. 2010. Microphotographs of cyanobacteria documenting the effects of various cell-lysis techniques. *U.S. Geological Survey Open-File Report*, 2010–1289, 203 p.

Rosen, J. & Hellena, K.E. 2008. Determination of the neurotoxin BMAA (b-N-methylamino-L-alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). Analyst, 133: 1785–1789.

Ruiz-Verdú, A., Simis S.G.H., de Hoyas C., Gons H.J. & Pena-Martinez, R. 2008. An Evaluation of Algorithms for the Remote Sensing of Cyanobacterial Biomass. *Remote Sensing of Environment,* 112: 3996–4008.

Sano, T.m Takagi, H., Nishikawa, M. & Kaya, K. 2008. NIES certified reference material for microcystins, hepatotoxic cyclic peptide toxins *from cyanobacterial blooms in eutrophic water bodies. Anal. Bioanal. Chem.*, 391(6): 2005-2010.

Sarazin, G., Quiblier-Llobéras, C., Bertru, G., Brient, L., Vezie, C., Bernard, C., Couté, A., Hennion, M.C., Robillot, C. & Tandeau de Marsac, N. 2002. Première évaluation du risque toxique lié aux cyanobactéries d'eau douce en France : le programme « EFFLOCYA », *Revue des Sciences de l'Eau*, 15(1): 315-326.

Schalles, J. & Yacobi Y. 2000. Remote detection and seasonal patterns of phycocyanin, carotenoid and chlorophyll pigments in eutrophic waters. *Archive Hydrobiological , Special Issues Advance Limnological,* 55: 153-168.

Sellner, K.G., Doucette, G.J. & Kirkpatrick, G.J. 2003. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *Journal of Industrial Microbial and Biotechnology*, 30: 383-406.

Shen, L., Xu, H. & Guo, X. 2012. Satellite remote sensing of harmful algal blooms (HABs) and a potential synthesized framework. Sensors (Switzerland), 12(6): 7778-7803.

Sicko-Goad, L.M., Stoermer, E.F., & Ladewski, B.G. 1977. A morphometric method for correcting phytoplankton cell volume estimates. *Protoplasma,* 93:147–63.

Simis, S. G. H., Ruiz-Verdù, A., Dominguez-Gomez, J. A., Pena-Martinez, R., Peters S. W. & Gons H. J. 2006. Influence of phytoplankton on remote sensing of cyanobacterial biomass. *Remote sensing of Environment,* 106:414-427.

Simis, S.G.H., Peters, S.W.M. & Gons H.J. 2005. Remote sensing of the cyanobacterial pigment phycocyanin in turbid water. *Limnology and Oceanography*, 50: 237-245.

Sjövall, O. & Meriluoto J.A.O. 2005. SOP: Analysis of microcystins by liquid chromatography – mass spectrometry. SOP_TOXIC_AAU_ 10F. In Meriluoto J. & Cood, G.A. (Ed.), *Toxic Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxins Analysis*, Acta Academiaee Aboensis, 65(1): 105-110.

Song, K., Li, L., Tedesco, L., Clercin, N., Hall, B., Li, S. Shi, K., Liu, D. & Sun, Y. 2013. Remote estimation of phycocyanin (PC) for inland waters coupled with YSI PC fluorescence probe. Environmental Science and Pollution Research, 20(8): 5330-5340.

Sotton, B. 2012. Mise en évidence des voies de transfert des cyanotoxines dans les lacs périalpins et implications dans les réponses physiologiques des poissons exposés. Mémoire de thèse de l'université de Grenoble, Grenoble, France, 176p.

Srivasta, A., SINGH, s., Ahn, C.Y., Oh, H.M. & Asthana, R.K. 2013. Monitoring approaches for a toxic cyanobacterial bloom. *Environmental Science and Technology*, 16: 8999-9013.

Steffenson. 2008. Chapter 37: Economic cost of cyanobacterial blooms, In Hundel H. K. (Ed.), *Cyanobacterial harmful algal blooms – State of the science and research needs*, Springer, 483-499.

Sun, J. & Liu, D.. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. Journal of Plankton research, 25 (11): 1331-1346.

Svrcek, C. & Smith, D.W. 2005. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *Journal of Engineering and Science*, 3: 155-185.

Swanepoel, A., Du Preez, H., Schoeman, C., van Vuuren, S.J. & Sundram, A. 2008. Condensed Laboratory methods for Monitoring phytoplankton, including Cyanobacteria, in south african Freshwaters. Report to the Water Research Commission BY Rand Water, 117p.

Szekielda, K.H., Marmorin, G.O., Maness, S.J., Donato, T., Bowles, J.H., Miller, W.D. & Rhea, W.J. 2007. Airborne hyperspectral imaging of cyanobacteria accumulations in the Potomac River. Journal of Applied Remote Sensing, 1(1) art. N° 013544.

Thomas, K., Blay, P., Burton, I.W., Cembella, A., Craft, C., Crain, S., Hardstaff, W.R., Laycock, M., LeBlanc, D., LeBlanc, P., Lewis, N., MacKinnon, S.L., Reeves, K., Walter, J., Windust, A.J. & Quilliam, M.A. 2004. Certified reference materials for marine algal toxins. , In: Harmful Algae 2002. Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., and Vargo, G.A. (Eds.) Florida Fish and Wildlife Conservation Commission and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, St. Petersburg, Florida, USA, 103p.

Törökné, A., Aszalos, M., Bánkiné, M., Bickel, H., Borbély, G., Carmeli, S., Codd, G. A., Fastner, J., Huang, Q., Humphage, A., Metcalf, J. S., Rábai, E., Sukenik, A., Surányi, G., Vasas, G. & Weiszfeiler, V. 2004. Interlaboratory comparison trial on cylindrospermopsin measurement. *Analytical Biochemistry*, 332: 280–284.

Törökné, A., Vasdinnyei, R. & Asztalos, B.M. 2006. A Rapid Microbiotest for the Detection of Cyanobacterial Toxins. Environmental Toxicology, 22(1):64-68.

Triantis, E., Tsimeli, K., Kaloudis, T., Thanassoulais, N., Lytras, E. & Hiskia, A. 2010. Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters. *Toxicon*, 55, 979-989.

US EPA. 2012. TechBrief – Environmental technology verification program : Immunoassay test kits for Microcystins. US EPA report N° EPA/600/S/12/511, USA, 2p.

Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitteilungen. Internationale Vereiningung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie,* 9: 1-38.

Utkilen, H., Fastner, J. & Batram, J. 1999. Fieldwork: site inspection and sampling – Chapter 11. In: I. Chorus, & J. Bartram (eds). *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. World Health Organisation, Londres United Kingdom, 400p.

Vadrucci, M.R., Cabrini, M. & Basset, A. 2007. Biovolume determination of phytoplankton guilds in transitional water ecosystems of Mediterranean Ecoregion. *Transitional Waters Bulletin,* 2: 83-102.

Van den Hoek, C., Mann, D.G. & Jahns, H.M. 1995. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.

Van Hove, P., Vincent, W.F., Galland, P. & Wilmotte, A. 2008. Abundance and diversity of picocyanobacteria in High Arctic lakes and fjords. *Algological Studies,* 168: 209-227.

Vaulot, D., Courties, C., & Partensky, F. 1989. A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. *Cytometry,* 10: 629-635.

Verity, P. G., Robertson, C. Y., Tronzo, C. R., Andrews, M. G., Nelson, J. R., & Sieracki, M. E. 1992. Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton. *Limnology and Oceanography*, 37: 1434–1446.

Vermont Environmental Health. 2008. Cyanobacteria (blue-green algae) : Guidance for Vermont Communities, 37p.

Vincent, W. F. 2009. Cyanobacteria. In Likens, G.E. (ed.), *Encyclopedia of Inland Waters*. Oxford: Academic Press.

Walsby, A.E. 1992. *A control of gas-vacuolate cyanobacteria.* In: Sutcliffe, D.W. and Jones, J.G. (eds.) Eutrophication: research and application to water supply. Ambleside, UK, Freshwater Biological Association, pp. 150-162.

Walsby, A. E. & Avery, A. 1996. Measurement of filamentous cyanobacteria by image analysis. *Journal of Microbiology: Methods,* 26 : 11-20.

Warren, A. 2011. Suivi des cyanobactéries en milieu lacustre par fluorimétrie *in vivo*. Université du Québec, Centre Eau Terre Environnement de l'Institut National de la Recherche Scientifique, 111p.

Warren A., P. Drogui & I. Laurion. 2010. Revue sur l’état actuel des connaissances des procédés utilisés pour l’élimination des cyanobactéries et cyanotoxines lors de la potabilisation des eaux. *Revue des Sciences de l’Eau*, 23(4), 391-412.

Wehr, J. D. & Sheath, R. G. 2003. *Freshwater algae of North America: Ecology and classification*. San Diego, USA: Academic Press.

Wetzel, R. G. & Likens, G. E. 2000. *Limnological analyses - 3rd edition.* Springer-Verlag, New York, 429p.

Willame, R. & Hoffmann, L. 2005. Les cyanobactéries (algues bleues) responsables d’efflorescences dans les eaux stagnantes - Aspects systématiques-écologiques toxicologiques. Rapport final du Centre de recherche public Gabriel Lippmann, 121p.

Wynne, T. T., Stumpf R.P., Tomlinson M.C., Warner R.A., Tester P.A., Dyble J. & Fahnenstiel G.L. 2008. Relating Spectral Shape to Cyanobacterial Blooms in the Laurentian Great Lakes. *International Journal of Remote Sensing,* 29: 3665–3672.

Zurawell, R. 2010. Alberta Environment Cyanotoxin Program Status Report. *Water Policy Branch Environmental Assurance Division Alberta Environment*, Alberta, Canada, ISBN: 978-0-7785-9014-9, 72p.

Annexe 1 - Questionnaire envoyé aux laboratoires privés, publics ou universitaires analysant les cyanobactéries et/ou les cyanotoxines à travers le monde



Objet : Développement d'une démarche uniformisée d'assurance/contrôle de la qualité pour l'analyse des cyanobactéries et des cyanotoxines.

Madame, Monsieur,

Les proliférations massives et rapides des cyanobactéries à travers le monde deviennent de plus en plus préoccupantes pour l'Environnement et la Santé Publique. Un inventaire des connaissances liées aux méthodes d'analyse des cyanobactéries et des cyanotoxines en utilisation à travers le monde semble être nécessaire pour améliorer la gestion des épisodes de fleurs d'eau de cyanobactéries au Québec.

Pour ce faire, l'Institut National de la Recherche Scientifique a été mandaté par le Fond Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies pour collecter des informations sur les méthodes d'analyse des cyanobactéries et des cyanotoxines en utilisation dans les laboratoires à travers le monde afin de permettre le développement d'une démarche uniformisée d'assurance/contrôle de la qualité.

Dans le cadre de ce projet, nous souhaiterions faire appel à votre expertise dans le domaine des cyanobactéries et des cyanotoxines pour obtenir des informations importantes sur vos méthodes d'analyse. Vous trouverez ci-joint un questionnaire qui ne prendra que quelques minutes à remplir. N'hésitez-pas à nous faire parvenir toute documentation ou le contact d'une personne-référence qui pourrait nous aider dans notre démarche.

Nous vous remercions par avance pour votre réponse et pour le temps que vous nous avez consacré. Veuillez agréer, Madame, Monsieur, l'expression de nos salutations les plus distinguées.

Enquête sur l'analyse des cyanobactéries et des cyanotoxines

Préparation des échantillons

1 Quel est le délai écoulé entre le prélèvement de l'échantillon et le dénombrement des cyanobactéries?

2 Quelle est la méthode de conservation des échantillons utilisée, depuis l'échantillonnage jusqu'à l'analyse? (préciser les concentrations des produits utilisés et le type de contenants).

Analyse des cyanobactéries

Quelle est la méthode de dénombrement utilisée?

- Si microscopie :
  - Quel type de microscope utilisez-vous?

    Inversé Droit

  - Utilisez-vous des chambres de sédimentation (Utermöhl) ou une autre méthode de concentration?

    Oui Autre (préciser)

  - Utilisez-vous la lumière blanche ou l'épifluorescence?

    Lumière blanche Épifluorescence

  - Quels sont les grossissements des oculaires et objectifs utilisés?

    x 100 x 400 x 1 000 Autre (préciser)

- La détermination taxonomique est-elle faite jusqu'au genre ou jusqu'à l'espèce?

  Genre Espèce

- Y a-t-il aussi un dénombrement des picocyanobactéries?

  Oui Non

- Quels sont les ouvrages de référence utilisés pour la détermination taxonomique?

- Quel est le nombre de champs observés pour un échantillon?

- Le choix des champs dénombrés est-il fait au hasard ou selon des transects?

  Au hasard Selon des transects

- Comment vos résultats sont-ils exprimés?
  - *Pour les taxons filamenteux (ex: Anabaena flos-aquae) :*

    Nombre de cellules Nombre de filaments

  - *Pour les taxons coloniaux (*ex : Microcystis aeruginosa) :

    Nombre de cellules Nombre de colonies

- Calculez-vous ensuite le biovolume total de chaque taxon?

  Oui Non

  Si oui, quelle est l'équation utilisée?

- Si autre méthode : Préciser laquelle et décrire succinctement. Donner les avantages et inconvénients..

Quel est le temps moyen passé sur un échantillon?

Analyse des cyanotoxines

Quel type de cyanotoxines analysez-vous?

Microcystine (préciser) Anatoxine-a Saxitoxine

Cylindrospermopsine Autre

Analysez-vous les toxines intra-celluaires, extra-cellulaires ou totales?

Intra-cellulaires Extra-cellulaires

Pour les toxines intra-cellulaires, quelle méthode utilisez-vous pour rompre les parois cellulaires?

Lyophilisation Congélation-décongélation Ultra-sonication

Veuillez préciser, si possible, la méthode utilisée en quelques mots

Quel type de solvant utilisez-vous pour l'extraction des toxines (pureté, proportion, taux de récupération estimée des toxines)?

- Microcystines :
- Anatoxine-a :
- Cylindrospermopsine :
- Saxitoxines :

Quelle méthode de purification des toxines utilisez-vous?

- Microcystines :

Cartouche SPE Cartouche Immuno-affinité

Veuillez préciser, si possible, le fournisseur, le coût, le taux de récupération estimé des toxines, le nombre de fois où les cartouches peuvent être utilisée, le mode opératoire

- Anatoxine-a :

Cartouche SPE Cartouche Immuno-affinité

Veuillez préciser, si possible, le fournisseur, le coût, le taux de récupération estimé des toxines, le nombre de fois où les cartouches peuvent être utilisée, le mode opératoire

- Cylindrospermopsine :

Cartouche SPE Cartouche Immuno-affinité

Veuillez préciser, si possible, le fournisseur, le coût, le taux de récupération estimé des toxines, le nombre de fois où les cartouches peuvent être utilisée, le mode opératoire

- Saxitoxines :

Cartouche SPE Cartouche Immuno-affinité

Veuillez préciser, si possible, le fournisseur, le coût, le taux de récupération estimé des toxines, le nombre de fois où les cartouches peuvent être utilisée, le mode opératoire

Quelle méthode de dosage des toxines intra-celluaire et/ou extra-cellulaire utilisez-vous?

- Microcystines :

Bioessais sur souris Test ELISA

HLPC/MS HPLC/UV HPLC/Fluorométrie

Tests Biochimique (PP2A) Autre (Préciser)

Quel type de colonne utilisez-vous?

Quel est votre fournisseur de solution standard?

Quelles sont vos limites de détection et de quantification?

Quels moyens utilisez-vous à chaque série d'analyse pour certifier vos résultats (ajouts dosés, contrôle certifié)

- Anatoxine-a :

Bioessais sur souris Test ELISA

HLPC/MS HPLC/UV HPLC/Fluorométrie

Tests Biochimique (PP2A) Autre (Préciser)

Quel type de colonne utilisez-vous?

Quel est votre fournisseur de solution standard?

Quelles sont vos limites de détection et de quantification?

Quels moyens utilisez-vous à chaque série d'analyse pour certifier vos résultats (ajouts dosés, contrôle certifié)

- Cylindrospermopsine :

Bioessais sur souris Test ELISA

HLPC/MS HPLC/UV HPLC/Fluorométrie

Tests Biochimique (PP2A) Autre (Préciser)

Quel type de colonne utilisez-vous?

Quel est votre fournisseur de solution standard?

Quelles sont vos limites de détection et de quantification?

Quels moyens utilisez-vous à chaque série d'analyse pour certifier vos résultats (ajouts dosés, contrôle certifié)

- Saxitoxines :

Bioessais sur souris Test ELISA

HLPC/MS HPLC/UV HPLC/Fluorométrie

Tests Biochimique (PP2A) Autre (Préciser)

Quel type de colonne utilisez-vous?

Quel est votre fournisseur de solution standard?

Quelles sont vos limites de détection et de quantification?

Quels moyens utilisez-vous à chaque série d'analyse pour certifier vos résultats (ajouts dosés, contrôle certifié)

Quels sont les coûts et durées moyens d'une analyse de toxines?

Quels sont les manuels ou protocoles de référence que vous utilisez pour la détermination et la quantification des cyanotoxines?

Quels sont les moyens de contrôles utilisés pour assurer la qualité des résultats (certification du laboratoire, analyses inter-laboratoire, utilisation de contrôles certifiés) et leur fréquence?

Université du Québec
Institut national de la recherche scientifique

Subject: Development of a standardized approach to assurance/quality control for the analysis of cyanobacteria and cyanotoxins.

Dear,

Massive proliferation of cyanobacteria across the world is becoming problematic for the environment and public health. An inventory of knowledge related to the methods in use around the world for the analysis of cyanobacteria and cyanotoxins is required to improve the management of the episode of cyanobacterial blooms in Quebec.

The Institut National de la Recherche Scientifique, INRS, (National Institute of Scientific Research) was commissioned by the Fond Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies, FQRNT, (Quebec Research Fund on Nature and Technologies) to collect information on the different methods in use across the world to analyze the cyanobacteria and cyanotoxins. To achieve this project, we require your expertise in the analysis of cyanobacteria and/or cyanotoxins to obtain important information. We would be grateful if you would kindly let us have information about the ways that you used for the assurance/quality control of your results. You will find an enclosed questionnaire that only takes a few minutes to complete.

Your answers will help us to develop a standardized approach of assurance/quality control for the analysis of cyanobacteria and cyanotoxins. Feel free to send us any documentation or the contact of a person reference that could help us. Thank you for your reply and for the time you spent answering our survey.

Best regards.

Cyanobacteria and cyanotoxins analysis survey

Sample storage

What is the time delay between samples collection and counting of cyanobacteria?

What is the method of samples preservation used from sampling to analysis? (Specify the concentrations of the products used and the type of container).

Cyanobacteria analysis

What is the counting method used?

- If microscopy :
  - Are you using an inverted or upright microscope?

    Inverted microscope   Upright microscope

  - Do you use sedimentation chambers (Utermöhl) or another method of concentration?

    Yes   Other (specify)

  - Do you use white light or fluorescent light?

    White light   Flurorescent light

  - What is the magnification of the lenses used?

    x 100   x 400   x 1 000

    Other (Specify)

- Does the taxonomic determination is made until genus or species?

Genus Species

- Do you also count picocyanobacteria?

Yes No

- What are the bibliographic references used for taxonomic determination?

- What is the number of fields observed for one sample?

- Do the fields are observed randomly or according to transects?

Randomly According to transects

- Are the results expressed as the concentration of cells or filaments?
  - *Regarding the filamentous taxa (eg, Anabaena flos-aquae):*

    cells concentration filaments concentration

  - *Regarding colonial taxa (eg Microcystis aeruginosa):*

    cells concentration colonies concentration

- Do you then calculate the total biovolume of each taxon?

  Yes No

  If yes, what is the equation used?

  - If you are using another method: Identify and briefly describe it. Give the advantages and disadvantages.

What is the average time spent on one sample?

Cyanotoxin analysis

What cyanotoxins do you analyze?

Microcystin (specify)   Anatoxin-a   Saxitoxin

Cylindrospermopsin   Other (specify)

Do you analyze intra-cellular, extra-cellular toxin or both of them?

Intra-cellular   Extra-cellular

For intra-cellular toxins, what method do you use to break the cell walls?

Freeze-drying   Freeze-thawing   Ultra-sonication

Please, specify in few words, the method used.

Which solvent do you use for the extraction of toxins (purity, amount, estimated toxins recovery)?

- Microcystins :
- Anatoxin-a :
- Cylindrospermopsin :
- Saxitoxins :

What method of toxins purification are you using?

- Microcystins

SPE cartridge   Immunoaffinity cartridge

Please specify, if possible, the procedure, the supplier, the cost, the estimated toxins recovery, the number of time the cartridges can be used.

- Anatoxin

SPE cartridge Immunoaffinity cartridge

Please specify, if possible, the procedure, the supplier, the cost, the estimated toxins recovery, the number of time the cartridges can be used.

- Cylindrospermopsin

SPE cartridge Immunoaffinity cartridge

Please specify, if possible, the procedure, the supplier, the cost, the estimated toxins recovery, the number of time the cartridges can be used.

- Saxitoxins

SPE cartridge Immunoaffinity cartridge

Please specify, if possible, the procedure, the supplier, the cost, the estimated toxins recovery, the number of time the cartridges can be used.

What method are you using for the quantification of intra-cellular and extra-cellular toxins?

- **Microcystins**

Mouse bioassay ELISA kit

HPLC/MS HPLC/UV HPLC/PDA

PP2A test Other (specify)

Please, specify the provider of the standards solutions and/or kits that you used for the analysis

If you use HPLC for quantification, which column do you use?

Please, specify the detection and quantification limits of the method

For each batch of analysis, which way dwhat method do you use to certify your results (spiking, certified check)?

- **Anatoxin**

Mouse bioassay ELISA kit

HPLC/MS HPLC/UV HPLC/PDA

PP2A test Other (specify)

Please, specify the provider of the standards solutions and/or kits that you used for the analysis

If you use HPLC for quantification, which column do you use?

Please, specify the detection and quantification limits of the method

For each batch of analysis, which way dwhat method do you use to certify your results (spiking, certified check)?

- **Cylindrospermopsin**

Mouse bioassay ELISA kit

HPLC/MS HPLC/UV HPLC/PDA

PP2A test Other (specify)

Please, specify the provider of the standards solutions and/or kits that you used for the analysis

If you use HPLC for quantification, which column do you use?

Please, specify the detection and quantification limits of the method

For each batch of analysis, which way dwhat method do you use to certify your results (spiking, certified check)?

- **Saxitoxins**

Mouse bioassay ELISA kit

HPLC/MS HPLC/UV HPLC/PDA

PP2A test Other (specify)

Please, specify the provider of the standards solutions and/or kits that you used for the analysis

If you use HPLC for quantification, which column do you use?

Please, specify the detection and quantification limits of the method

For each batch of analysis, which way dwhat method do you use to certify your results (spiking, certified check)?

What are approximately the costs and duration for an analysis of cyanotoxins?

Which manual or protocol do you use for the determination and the quantification of cyanotoxins?

What ways are you using to ensure the quality of results (laboratory certification, inter-laboratory analyzes, use of certified solutions = controls) and their frequency?

Annexe 2 - Liste des laboratoires privés, publics et universitaires contactés

Pays	Nom du laboratoire	Adresse courriel	Personne contactée
Afrique du Sud	Department of Water Affairs and Forestry Resource Quality Services	carin.vanginkel@gmail.com	Carin Van Ginkel
Afrique du Sud	Randwater	aswanepo@randwater.co.za	Annelie Swanepoel
Afrique du Sud	Umgeni	chris.dickens@umgeni.co.za	Chris Dickens
Afrique du Sud	Nelson Mandela Metropolitan University	tim.downing@nmmu.ac.za	Tim Downing
Afrique du Sud	University of Pretoria	AMBO@SUN.AC.ZA	Anna Maria Oberholster
Allemagne	Cyanobiotech Gmhb	info@cyano-biotech.com	Dan Kramer
Allemagne	University of Potsdam	editt@uni-potsdam.de	Elke Dittmann
Arabie Saodite	Umm Al-Qura University	Allyal@uqu.edu.sa	Khaled Al-Layl
Argentine	Universidad de Cordoba	vame@fcq.unc.edu.ar	Valérie Amé
Australie	Sydney Water Monitoring Services	paul.harley@sydneywater.com.au	P Harley
Australie	ALS Environnement - New Castle	ALSEnviro.Newcastle@alsglobal.com	Standard
Australie	ALS Environnement - Perth	ALSEnviro.Perth@alsglobal.com	Standard
Australie	ALS Environnement - Melbourne	ALSEnviro.Melbourne@alsglobal.com	Standard
Australie	ALS Environnement - Brisbane	ALSEnviro.Brisbane@alsglobal.com	Standard
Australie	ALS Environnement - Sydney	ALSEnviro.Sydney@alsglobal.com	Standard
Australie	ALS Environnement - Melbourne	ALSEnviro.Adelaide@alsglobal.com	Standard
Australie	ALS Water resources Group	ramya.watawala@alsglobal.com	Ramya Watawala
Australie	ALS Water resources Group	Tony.seller@alsglobal.com	Tony Seller

Pays	Nom du laboratoire	Adresse courriel	Personne contactée
Australie	ALS Water resources Group	frank.matthies@alsglobal.com	Frank Matthies
Australie	ALS Water resources Group	Kerri.Taylor@alsenviro.com	Kerri Taylor
Australie	AWCQ	gayle.newcombe@sawater.com.au	Gayle Newcombe
Australie	AWCQ	awqc@sawater.com.au	Christian Saint
Australie	AWCQ	mike.burch@sawater.com.au	Mike Burch
Australie	AWCQ	awqc@sawater.com.au	Brenton Nicholson
Australie	AWCQ	andrew.humphrage@sawater.com.au	Andrew Humprage
Australie	AWCQ	awqc@sawater.com.au	Dennis Steffensen
Australie	AWCQ	awqc@sawater.com.au	Karen Simpson
Australie	NSW Office of water	john.brayan@dnr.nsw.gov.au	John Brayan
Australie	NSW Office of water	'information@water.nsw.gov.au'	Standard
Australie	NSW Office of Water	lee.bowling@water.nsw.gov.au	Lee Bowling
Australie	Analytical Services Tasmania	stephanie.fulton@environment.tas.gov.au	Stéphanie Fulton
Australie	Queensland Urban Utilities	Bob.Gray@urbanutilities.com.au	Bob Gray
Australie	Queensland Health	John_Bates@health.qld.gov.au	John Bates
Australie	SGS Australia Pty Ltd	megan.brine@sgs.com	Megan Brine
Australie	Hunter Water Australia	info@hwa.com.au	Standard
Australie	Hunter Water Australia	robin.woodward@hwa.com.au	R. Woodward
Australie	Tweed Sire Council	paulw@tweed.nsw.gov.au	P. Wright
Australie	PortMacquarie Hastings Council	maree.smith@pmhc.nsw.gov.au	M. Smith
Australie	Ecoscope Environmental Pty Ltd	ecoscope@bigpond.net.au	H R Howell
Australie	The University of Western Australia	Anas.Ghadouani@uwa.edu.au	Anas Ghadouani
Australie	National Resource Science	glenn.mcgregor@nrw.qld.gov.au	Glenn McGregor
Autriche	University of Innsbruck	rainer.kurmayer@uibk.ac.at	Rainer Kurmayer
Bangladesh	Bangladesh Agricultural University	salehamk@bdcom.com	Saleha Khan

Pays	Nom du laboratoire	Adresse courriel	Personne contactée
Belgique	FUNDP / Université de Namur	jean-pierre.descy@unamur.be	Jean-Pierre Descy
Belgique	Vrije Universiteit Brussel	ltriest@vub.ac.be	Ludwig Triest
Belgique	Université de Liège	awilmotte@ulg.ac.be	Annick Wilmotte
Belgique	Ghent University	wim.Vyverman@ugent.be	Wim Vyverman
Bresil	Federal University of Ceara	silvanopereira@terra.com.br	Lenora Nunes Ludolf Gomes
Brésil	Federal University of Rio de Janeiro	sazevedo@biof.ufrj.br	S. Azevedo
Bulgarie	Sofia University	mstoyneva@abv.bg'	Maya Stoyneva
Bulgarie	Plovdiv University	teneva@uni-plovdiv.bg	Ivanka Teneva
Bulgarie	Sofia University	vera_pavlova@abv.bg	Vera Pavlova
Canada	AES Environnement	analyses@AESenvironnement.com	Standard
Canada	Health Canada - Food Research Division	Thea.Rawn@hc-sc.gc.ca	Thea Rawn
Canada	Health Canada - Food Research Division	terry.koerner@hc-sc.gc.ca	Terry Koerner
Canada	Institute for Marine Biosciences, National Research Council Canada	Nancy.Lewis@nrc-cnrc.gc.ca	Nancy Lewis
Canada	University of British Columbia	maxt@unixg.ubc.ca	Max Taylor
Canada	University of Ottawa	frpick@uOttawa.ca	Frances Pick
Canada	University of Saskatchewan	jeff.hudson@usask.ca	Jeff Hudson
Chine	ALS Environnement	beijing@alsglobal.com	Standard
Chine	ALS Environnement	shanghai@alsglobal.com	Standard
Croatie	University of Zagreb	sorlic@irb.hr	Sandi Orlic
Danemark	DHI Laboratories	c14@dhigroup.com	Camilla Hedberg
Danemark	Aarhus University	pet@dmu.dk	Peter Henriksen
Écosse	University of Stirling	a.n.tyler@stir.ac.uk	Andrew N Tyler
Espagne	Universidad de Zaragoza	mpeleato@unizar.es	María Luisa Peleato Sánchez
Espagne	CEAB-CSIC	puig@ceab.csic.es	Maria Angeles Puig

Pays	Nom du laboratoire	Adresse courriel	Personne contactée
Espagne	IDEAE-CSIC	cintia.flores@idaea.csic.es	Cintia Flores
Espagne	IDEAE-CSIC	josep.caixach@cid.csic.es	Josep Caixach
Espagne	Universidad Automona de Madrid	antonio.quesada@uam.es	Antonio Quesada
Espagne	University de Seville	angelesjos@us.es	Angeles Jos Gallego
Espagne	Universidad Computense de Madrid	mhernan@bio.ucm.es	Mercedes Hernandez
Espagne	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries	monica.campas@irta.cat	Mònica Campàs
Espagne	Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza	mpeleato@unizar.es	María Luisa Peleato Sánchez
Estonie	Estonian University of Life Sciences	kylli.kangur@emu.ee	Kulli Kangur
Estonie	National Institute of Chemical Physics and Biophysic	risto.tanner@kbfi.ee	Risto Tanner
Finlande	SYKE	Pirjo.Sainio@ymparisto.fi	P. Sainio
Finlande	Abo Akademi University	jussi.meriluoto@abo.fi	Jussi Meriluoto
Finlande	Abo Akademi University	lisa.spoof@abo.fi	Lisa Spoof
Finlande	Abo Akademi University	khaggqvi@abo.fi	Kerstin Haggqvist
Finlande	University of Helsinki	kaarina.sivonen@helsinki.fi	Kaarina Sivonen
Finlande	Finnish Food Safety Authority Evira	olli.sjovall@sakyla.fi	Olli Sjovall
France	IDAC	idac.sd@loire-atlantique.fr	Standard
France	Centre d'analyse expérimentales	lise-renee.lataste@veolia.com	lise renée lataste
France	Laboratoire d'étude et de recherche en environnement	Delphine.chauvin@ehesp.fr	Delphine Chauvin
France	Eurofins IPL	caroline.chauliac@ipl-groupe.fr	Caroline Chauliac
France	Eurofins IPL	jeanluctaborin@eurofins.com	Jean-Luc Taborin
France	Eurofins IPL	hydrologie@eurofins.com	Standard

Pays	Nom du laboratoire	Adresse courriel	Personne contactée
France	Eurofins IPL	hydrologie@eurofins.com	Philippe Lacoste
France	Laboratoire départemental d'analyses de la Corrèze	lda@cg19.fr	Standard
France	AquaGestion	Philippe COMBROUZE [aqua.gestion@orange.fr]	Philippe Combrouze
France	OEHC	http://www.oehc.fr/messagerie.asp	Standard
France	LDA 22	jegomagali@cg22.fr	Magali Jego
France	Alcycor	http://www.alcycor.com/contact.html	Manon Antoine
France	Bouisson Bertrand Laboratoires	-	Standard
France	Laboratoire municipal Saint-Etienne	http://www.fourni-labo.fr/entreprise/laboratoire-municipal--st-etienne-500008507.html	Standard
France	Bi-Eau	bieau@unimail.fr; contact@bieau.fr	Maria Leitao
France	Centre d'Ingénierie Aquatique et Écologique (C.I.A.E.).	ciae@ciae-nemours.com	Christian Martin
France	Institut Louise Blanquet - Clermont	hydrologie@eurofins.com	Raphael Vaivre
France	Laboratoire départemental de l'eau	lde31@cg31.fr	Standard
France	Laboratoire d'eau de Paris	http://www.eaudeparis.fr/page/contact?page_id=124	Standard
France	Anjou Laboratoire (ancien LD2H)	v.larvor@cg49.fr	Vanessa Larvor
France	INRA Thonon	orlane.anneville@thonon.inra.fr	Orlane Anneville
France	INRA Thonon	isabelle.domaizon@thonon.inra.fr	Isabelle Domaizon
France	ATHOS Environnement Université Blaise Pascal	marie-eve.mauduit@athos-environnement.fr	Marie Eve Mauduit
France	Laboratoire de sécurité des aliments (ANSES)	laurent.laloux@anses.fr	Laurent Laloux
France	Laboratoire de sécurité des aliments (ANSES)	sophie.krys@anses.fr	Sophie Krys
France	Groupe CARSO	http://www.groupecarso.com/contact.php	Standard
France	Critt	critt-bioindustries@critt.net	Standard

Pays	Nom du laboratoire	Adresse courriel	Personne contactée
France	IDHESA (Laboratoire Accrédité)	eric.laporte@idhesa.fr	Eric Laporte
France	UMR CNRS 6023 Microorganismes : Génome et Environnement	Delphine.LATOUR@univ-bpclermont.fr	Delphine Latour
France	CHU Limoges	labo.pharmaco@chu-limoges.fr	Pr Christian Moesh
France	Muséum National d'Histoire Naturelle USM 505, Ecosystèmes et Interactions toxiques	quiblier@mnhn.fr	Catherine Quiblier
France	Muséum National d'Histoire Naturelle USM 505, Ecosystèmes et Interactions toxiques	cbernard@mnhn.fr	Cécile Bernard
France	Muséum National d'Histoire Naturelle USM 505, Ecosystèmes et Interactions toxiques	arnocat@mnhn.fr	Arnaud Catherine
France	Université de Rennes 1	myriam.bormans@univ-rennes1.fr	Myriam Bormans
France	Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution - UMR 8079	noureddine.bouaicha@u-psud.fr	Noureddine Bouaïcha
France	Laboratoire Charles Friedel ENSCP	cbernard@mnhn.fr	Olivier Ploux
France	Université de Rennes UMR CNRS 6553 Ecobio	luc.brient@univ-rennes1.fr	Luc Brient
Grèce	National Center of Scientific Research “Demokritos” - Laboratory for environmental analysis	hiskia@chem.demokritos.gr	Hiskia Anastasia
Grèce	National Center of Scientific Research “Demokritos” - Laboratory for environmental analysis	triantis@chem.demokritos.gr	Theodoros Triantis

Pays	Nom du laboratoire	Adresse courriel	Personne contactée
Grèce	National Center of Scientific Research “Demokritos” - Laboratory for environmental analysis	zervou@chem.demokritos.gr	Sevasti Zervou
Grèce	National Center of Scientific Research “Demokritos” - Laboratory for environmental analysis	theodorafotiou@chem.demokritos.gr	Theodora Fotiou
Grèce	University of Thessaly	kkormas@uth.gr	Konstantinos Kormas
Grèce	University of Thessaly	mkatsiap@bio.auth.gr	Matina Katsiapi
Grèce	University of Thessaly	mmustaka@bio.auth.gr	Prof. M. Moustaka-Gouni
Grèce	Democritus University of Thrace	ikagkalo@civil.duth.gr	Ifigenia Kagkalou
Grèce		lanaras@bio.auth.gr	Thomas Lanaras
Hong Kong	ALS Environnement	hongkong@alsglobal.com	Standard
Hongrie	University of Debrecen	vasas.gabor@science.unideb.hu	Gabor Vasas
Inde	Daksh Laboratory	DAKSHLABS@GMAIL.COM	Standard
Inde	Department of Biotechnology, Utkal University	adhikary2k@hotmail.com	Siba Adhikary
Inde	National Environmental Engineering Research Institute	ln_sangolkar@neeri.res.in	Lalita N. Sangolkar
Inde	R.D. University - Department Bological Sciences	snbagchi_in@yahoo.com	Suvendra Nath Bagchi
Inde	Banaras Hindu University, Varanasi	hgashok@rvce.edu.in	H.G. Ashok Kumar
Indonésie	ALS Environnement	bogor@alsglobal.co.id	Standard
Irlande	Cork Institute of Technology	ambrose.furey@cit.ie	Ambrose Furey
Israel	Israel Oceanographic & Limnological Research	assaf@ocean.org.il	Assaf Sukenik
Italie	Laboratorio di Igiene Ambientale	milena.bruno@iss.it	Milena Bruno

Pays	Nom du laboratoire	Adresse courriel	Personne contactée
Italie	Fondazione Edmund Mach Instituto Agrario di S Michele allAdigeVia E. Mach	nico.salmaso@fmach.it	Nico Salmaso
Italie	University of Rome, Department of Biology	roberta.congestri@uniroma2.it	Roberta Congresti
Italie	Fondazione Edmund Machcentro ricerca ed Innovazione	leonardo.cerasino@fmach.it	Leonardo Cerasino
Japon	NIES	sanotomo@nies.go.jp	Sano Tomo
Japon	Japan Food Research Labotory	yasumotot@jfrl.or.jp	Takeshi Yasumoto
Japon	University of Tokyo	-	Standard
Japon	National Institute for Environmental Studies	sanotomo@nies.go.jp	Tomoharu Sano
Japon	Kitasato University	akodama@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp	-
Kenya	University of Nairobi	mwauraf@uonbi.ac.ke	Francis Mwaura
Lituanie	Nature research Center	jurate.kasperoviciene@gmail.com	Jurate Kasperoviciene
Lituanie	Klaipeda University	renata@corpi.ku.lt	Renata Pilkaityte
Luxembourg	Centre de recherche public Gabriel Lippmann	http://www.crpgl.lu/index.php?id=90	Henri-Michel Cauchie
Macédoine	Université "St.Cyril and Methodius" - Faculté des Sciences Naturelles et Mathématiques	krsticsvetislav08@gmail.com	Svetislav Krstic
Macédoine	Université "St.Cyril and Methodius" - Faculté des Sciences Naturelles et Mathématiques	krsticsvetislav08@gmail.com	Svetislav Krstic
Malaisie	ALS Environnement	kualalumpur@alsglobal.com.my	Standard
Maroc	Faculté des sciences de Casablanca Aïn Chock	'f.zidane@fsac.ac.ma'	Zidane Fatika
Maroc	Med 1er University and IFCS	abdellatifm@hotmail.com	Abdellatif Maamri
Namibie	Namwater	Kangootuil@namwater.com.na	Honga Ehrenfried
Norvège	Norwegian Institut for Water Research	sigrid.haande@niva.no	Sigrid Haande

Pays	Nom du laboratoire	Adresse courriel	Personne contactée
Norvège	Norwegian Institut for Water Research	andreas.ballot@niva.no	Andreas Ballot
Norvège	Norwegian Vetetinary Institute	sha@niva.no	Standard
Norvège	NorwegianVetetinary Institute	chris.miles@vetinst.no	Chris Miles
Nouvelle-Zélande	Cawthron Nelson	-	Jonathan Puddick
Nouvelle-Zélande	NIWA	-	Standard
Nouvelle-Zélande	Watercare Service	-	Peter Boniface
Nouvelle-Zélande	University of Waikato	-	Jonathan Puddick
Pakistan	University of Karachi (anciennement)	s.hameed@rgu.ac.uk	Shaista Hameed
Pays Bas	Aquon	info@aquon.nl	Standard
Pays Bas	Koeman en Bijkerk bv	info@koemanenbijkerk.nl	Standard
Pays-Bas	University of Amsterdam	P.M.Visser@uva.nl	Petra Visser
Pays-Bas	University of Amsterdam	hans.matthijs@science.uva.nl	Hans Matthijs
Pays-Bas	Wageningen University and Research	miquel.lurling@wur.nl	Miquel Lurling
Pays-Bas	Koeman & Bijkerk	info@koemanenbijkerk.nl	Standard
Pologne	University of Gdansk	biohm@ug.edi.pl	Hanna Mazur-Marzec
Pologne	University of Warsaw	jasser.iwona@biol.uw.edu.pl	Iwona Jasser
Pologne	Adam Mickiewizc University	kok@amu.edu.pl	Standard
Pologne	University of Lodz	k.izydorczyk@erce.unesco.lodz.pl	Katarzyna Izydorczyk
Pologne	University of Lodz	m.zalewski@erce.unesco.lodz.pl	Maciej Zalewski
Pologne	European Regional Centre for Ecohydrology	j.mankiewicz@erce.unesco.lodz.pl	J. Mankiewicz
Portugal	CIIMAR Marine and Environmental Research Center	vmvascon@fc.up.pt	Vitor Vasconcelos
Portugal	Instituto superior technico	ricardosantos@ist.utl.pt	Ricardo Santos

Pays	Nom du laboratoire	Adresse courriel	Personne contactée
Portugal	University of Porto	vmvascon@fc.up.pt	Vitor Vasconcelos
Portugal	Instituto superior technico	silvia.monteiro@ist.utl.pt	S. Monteiro
République Tchèque	RECETOX	blaha@recetox.muni.cz	Ludek Blaha
République Tchèque	Centre for cyanobacteria and their toxins	sinice@sinice.cz	Standard
République Tchèque	RECETOX University of Sciences	marsalek@mail.muni.cz	Blahoslav Marsálek
République Tchèque	RECETOX University of Sciences	blaha@recetox.muni.cz	Ludek Blaha
République Tchèque	Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Botany	lukavsky@botany.cas.cz	JAROMÍR LUKAVSKÝ
Serbie	University of Novi Sad	zorica.svircev@dbe.uns.ac.rs	Zorica Svircev
Singapore	ALS Environnement	info@alsglobal.com.my	Standard
Slovaquie	Public Health Authority of Slovak Republic	zuzana.sirotna@uvzsr.sk	Zuzana Sirotna
Slovénie	National Institute of Biology Vecan Pot	bojana.zegura@nib.si	B. Zegura
Slovénie	National Institute of Biology Vecan Pot	tina.elersek@nib.si	Tina Erlesek
Sri Lanka	University of Peradeniya	ananda@kulasooriya.com	S.A.Kulasooriya
Sri Lanka	University of Ruhuna	lpj@bot.ruh.ac.lk	L. P.Jayatissa
Suède	Stockholm university	ulla.rasmussen@botan.su.se	Ulla Rasmussen
Suède	Stockholm university	jonasson@botan.su.se	Sara Jonasson
Suisse	Limnological station, University of Zurich	blom@limnol.uzh.ch	Judith F. Blom
Suisse	Institut FA Forel, Universite de Genève	Bastiaan.Ibelings@unige.ch	Bastiaan Ibelings
Taiwan	ALS Environnement	feeling.hu@alsglobal.com	Standard
Thailande	Thailand Institute of Scientific and Technological	aparat@tistr.or.th	Aparat Mahakhant
Thaïlande	ALS Environnement	mktdept_th@alsglobal.com	Standard
Thaïlande	ALS Environnement	alsthai@alsglobal.com	Standard
Thaïlande	ALS Environnement	rayong@alsglobal.com	Standard

Pays	Nom du laboratoire	Adresse courriel	Personne contactée
Thaïlande	ALS Environnement	Chiangmai@alsglobal.com	Standard
Turquie	Istanbul University	albay.hermano@gmail.com	Meric Albay
Turquie	Istanbul University	rakcaalan@gmail.com	Reyhan Akcaalan Albay
UK	University of Dundee Department of Molecular Microbiology	g.a.codd@dundee.ac.uk	G.A. Codd
UK	Robert Gordon University	l.lawton@rgu.ac.uk	Linda Lawton
USA	Microbiological and Chemical Exposure Assessment Research Division	Delacruz.Armah@epamail.epa.gov	Armah A. De La Cruz
USA	Microbac	Wade.Delong@microbac.com	Wade DeLong
USA	All Things Water	tdatw@aquamogmidwest.com; heath@allthingsh2o.com	Standard
USA	Aquatic Control Inc	sales@aquaticcontrol.com	Standard
USA	BSA Environmental Services, Inc	j.beaver@bsaenv.com	John Beaver
USA	CH2M Hill Applied Science Laboratory	Mark.Boedigheimer@ch2m.com	Mark Boedigheimer
USA	Davey Resource Group	kkrouse@davey.com	K Krouse
USA	EMSL Analytical	info@emsl.com; jdobranic@emsl.com	Standard + Jason Dobanic
USA	GreenWater Laboratories	markaubel@greenwaterlab.com';	Mark Aubel
USA	Ponds Rx	LakesRx@comcast.net	Mark Litwiler
USA	SePRO research and Technology Campus	srtclab@sepro.com	Standard
USA	University of Wisconsin - Wisconsin State Laboratory of Hygiene	dawn.perkins@slh.wisc.edu	Dawn AK Perkins
USA	University of Wisconsin - Wisconsin State Laboratory of Hygiene	jhs@mail.slh.wisc.edu	John Strandidge
USA	Water Management Laboratories	info@watermanagement.com	Standard
USA	USGS - Organic Geochemistry Research Laboratory Services	http://answers.usgs.gov/cgi-bin/gsanswers	Standard

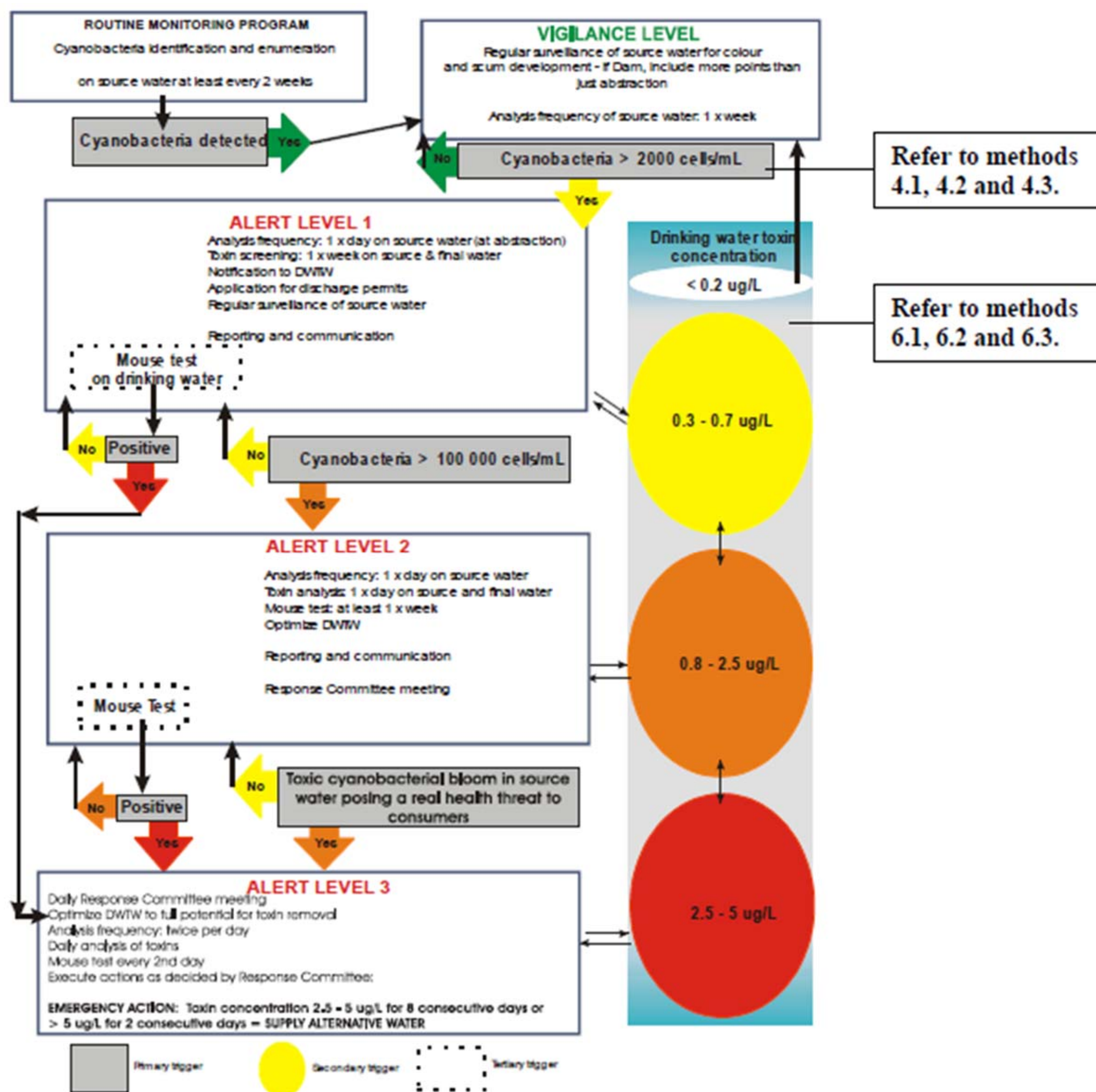
Pays	Nom du laboratoire	Adresse courriel	Personne contactée
USA	USGS - Organic Geochemistry Research Laboratory Services	kloftin@usgs.gov	Keith Loftin
USA	King County Environmental Lab	eric.thompson@kingcounty.gov	Eric Thompson
USA	SUNY-CESF	glboyer@esf.edu	Greg Boyer
USA	Lake Superior State University - EAL	bsouthwell@lssu.edu	Standard
USA	National Center for Marine Algae and Microbiota	wwilson@bigelow.org	William Wilson
USA	National Center for Marine Algae and Microbiota	RAA48@U.Washington.edu	Robert Andersen
USA	USEPA	Sinclair.james@epa.gov	James Sinclair
USA	Iowa State University Limnology Laboratory	lakes@iastate.edu; downing@iastate.edu	John Downing
USA	Nebraska Department of Environmental Quality	NDEQ.moreinfo@Nebraska.gov	Standard
USA	USEPA Region 9 Laboratories	Lincoff.Andy@epa.gov	Standard
USA	USEPA Region 9 Laboratories	Bauer.Richard@epa.gov	Standard
USA	USEPA Region 9 Laboratories	Jones.Lucrina@epa.gov	Standard
USA	Wright State University	wayne.carmichael@wright.edu	Wayne Carmichael
USA	University of Arizona, Environmental Research Laboratory	dwalker@ag.arizona.edu	David Walker
USA	Eurofins Eaton Analytical	EdWilson@eurofinsUS.com	Ed Wilson
USA	Eurofins Eaton Analytical	AndyEaton@eurofinsUS.com	Andy Eaton
USA	Eurofins Eaton Analytical	PollyBarrowman@eurofinsUS.com	Polly Barrowman
USA -	CA Dept of Fish and Game	dcrane@ospr.dfg.ca.gov	Dave Crane
Zimbabwe	University of Zimbabwe,	wmhlanga@africaonline.co.zw	Nomusa Mhlanga

Annexe 3- Liste des personnes-ressources contactées

Pays	Nom de l'établissement	Adresse courriel	Personne contactée
Afrique du Sud	CSIR	pashton@csir.co.za	Peter Ashton
Allemagne	Federal Environmental Agency	ingrid.chorus@uba.de	Ingrid Chorus
Allemagne	Federal Environmental Agency	jutta.fastner@uba.de	Jutta Fastner
Australie	Australian National Algae Culture Collection - CSRICO	Susan.Blackburn@csiro.au	Susan Blackburn
Australie	Queensland Health Scientific Services	g.eaglesham1@uq.edu.au	Geoffrey Eaglesham
Australie	Water Services Association of Australia	Peter.donlon@wsaa.asn.au	Peter Donlon
Australie	Queensland Department of Environment and Resource Management	glenn.mcgregor@derm.qld.gov.au	Glenn McGregor
Canada	Centre de Recherche et de Développement sur le Bovin Laitier et le Porc	khalida.bekri@agr.gc.ca	Khalida Bekri
Canada	Institute for Marine Biosciences, National Research Council Canada	michael.quilliam@nrc-cnrc.gc.ca	Michael Quilliam
Canada	Health Canada Food Research Division Ottawa	Thea_Rawn@hc-sc.gc.ca	Thea Rawn
Espagne	CRIT - Centre for Research and Innovation in Toxicology - Technical University of Catalonia (UPC)	riva@crit.upc.edu	Dr M. Carmen Riva
Espagne	CRIT - Centre for Research and Innovation in Toxicology - Technical University of Catalonia	ribo@crit.upc.edu	Dr. Juan Ribo
France	ARS Auvergne	gilles.bidet@ars.sante.fr	Gilles Bidet
France	AGLAE	http://www.association-aglae.fr/index.php?page=contacts	Standard
France	Agence del'eau Seine-Normandie	DUCHEMIN.Jean@aesn.fr	Jean Duchemin
France	Ecole nationale de santé publique	Michele.Legeas@ensp.fr	Michèle LEGEAS
France	ARS Manche	ars-dt50-sante-environnement@ars.sante.fr	Sylvie Allix
France	ARS Pays de la Loire	ars-pdl-contact@ars.sante.fr	Maryannick Pratt

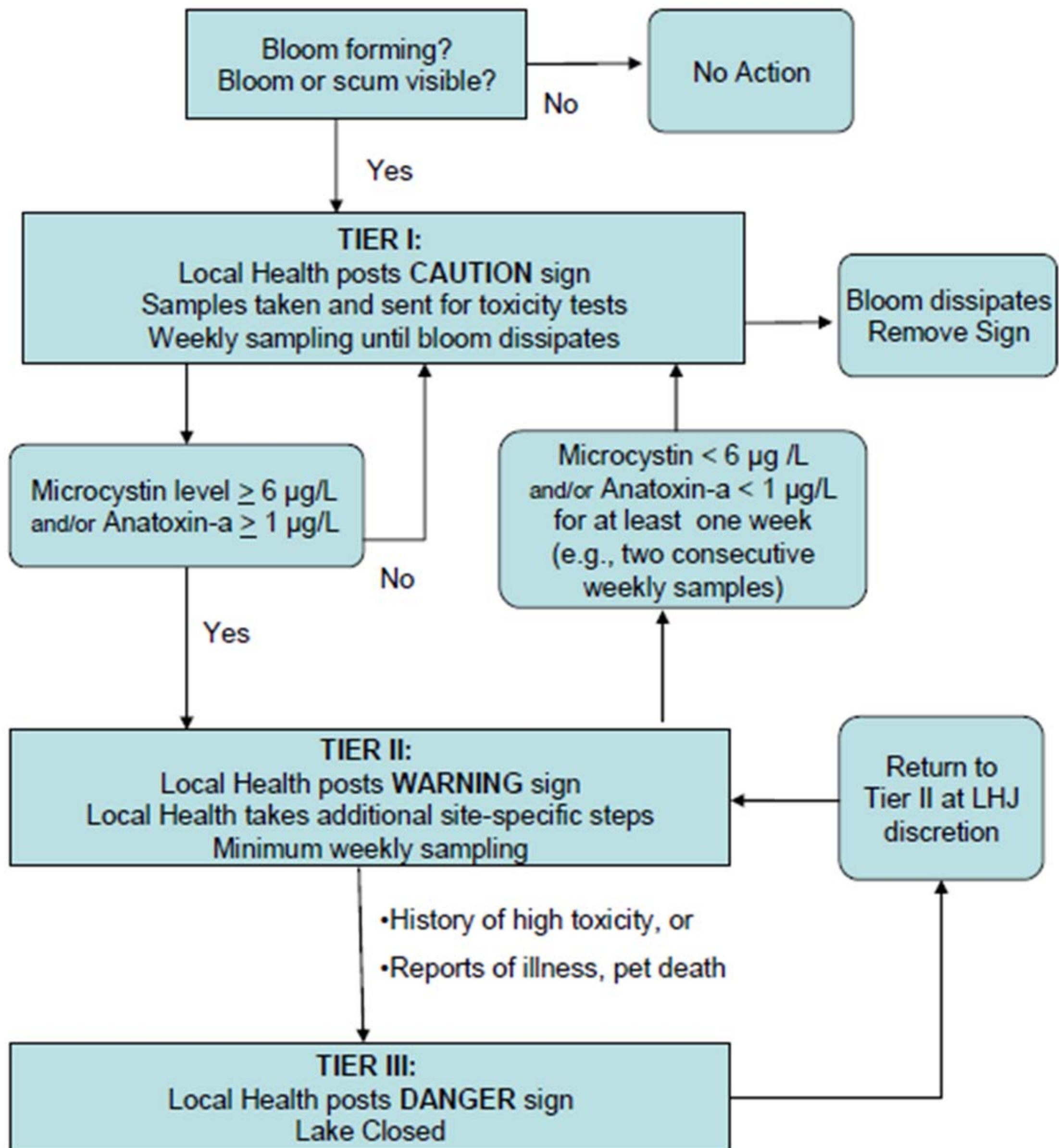
Pays	Nom de l'établissement	Adresse courriel	Personne contactée
France	ARS Bretagne	thierry.panaget@ars.gouv.fr	Thierry Panaget
France	Afssa	m.harvey@afssa.fr	Mathilde Harvey
France	IRSTEA	alain.dutartre@irstea.fr	Alain Dutartre
Hongrie	National Institute of Environmental Health	torok.andrea@oki.antsz.hu	Andrea Torokne Kormas
Italie	Istituto Superiore di Sanita	milena.bruno@iss.it	Milena Bruno
Nouvelle-Zélande	NIWA	Karl.Safi@niwa.co.nz	Karl Safi
Nouvelle-Zélande	NIWA	k.thompson@niwa.co.nz	Karen Thompson
Nouvelle-Zélande	NIWA	h.brider@niwa.co.nz	Helen Brider
Portugal	Ministère de la Santé	filomena@dgsaude.min-saude.pt	Filomena Araujo
Slovaquie	Public Health Authority of Slovak Republic	maria.horecka@uvzsr.sk	Maria Hocheka
Suisse	Stadt Zurich - Departement der Industriellen Betriebe	wvz-kundendienst@zuerich.ch	Standard
USA	Water Institute at UNC Gillings School of Global Public Health - University of North Carolina	jbartram@email.unc.edu	Jamie Bartram
USA	State of Alaska - Division of Environmental Health	Patryce.McKinney@Alaska.gov	Patryce McKinney
USA	Coordinator Aquatic Toxins Program Division of Environmental Health Florida Department of Health	andy_reich@doh.state.fl.us	Andy Reich

Annexe 4 - Exemple d'arbre décisionnel mis en place pour la gestion des eaux de consommation – Afrique du Sud

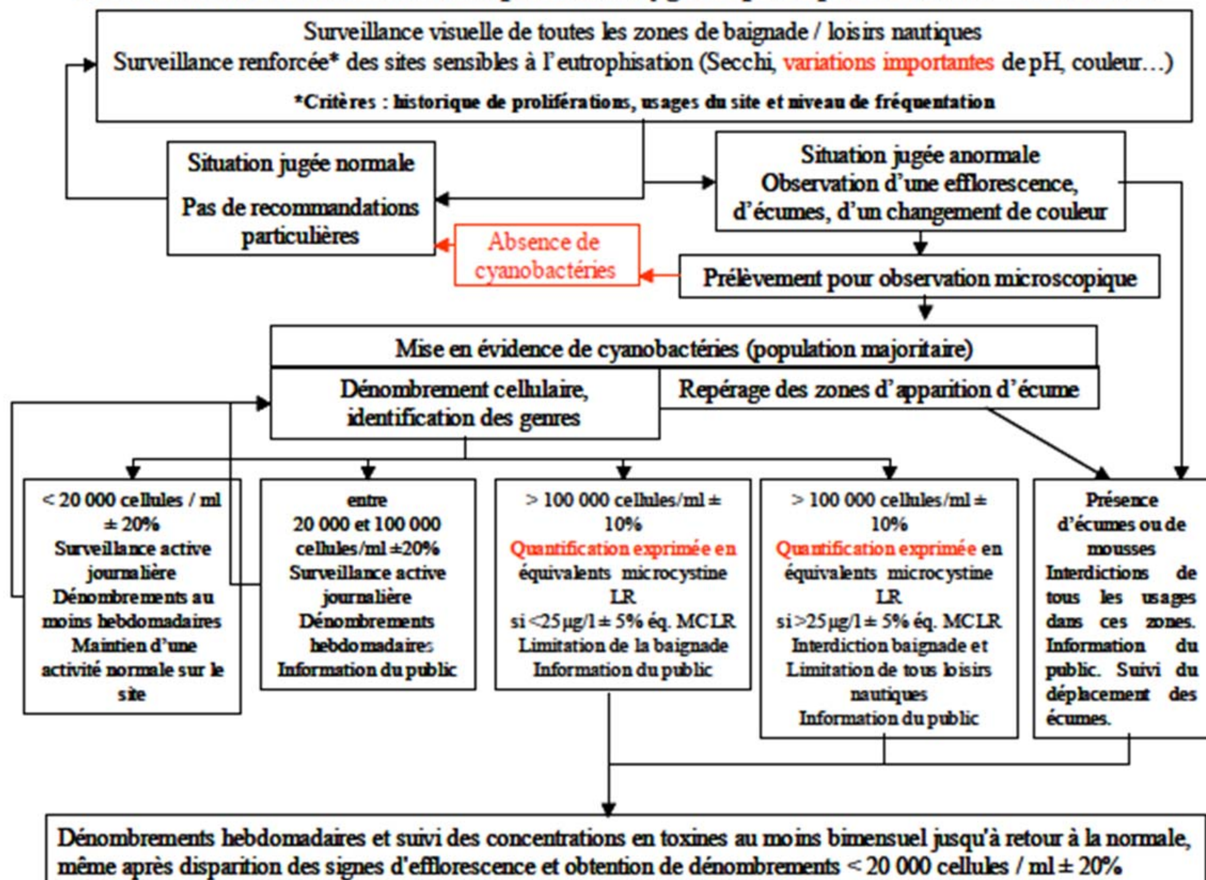


Arbre décisionnel mis en place pour la gestion des eaux de consommation en Afrique du Sud émanant de RandWater et des fournisseurs d'eau potable (Swanepoel et al. 2008)

Annexe 5- Exemples d’arbre décisionnel mis en place pour la gestion des eaux de récréatives – Washington et France



Arbre décisionnel relatif à la prolifération de cyanobacétries et/ou cyanotoxines dans les eaux récréatives et plans d’eau aidant à la gestion des plans d’eau à Washington (d’après Hardy 2008)



Arbre décisionnel émanant du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France relatif à la prolifération de cyanobactéries dans les eaux récréatives en France (d'après Willame et Hoffmann 2005)

Annexe 6 - Références taxonomiques utilisées dans le monde

Références anglophones

Anagnostidis, K., & Komarek, J. 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3-Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie*, 50: 327-472.

Anagnostidis, K., & Komarek, J. 1990. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 5-Stigonematales. *Archiv für Hydrobiologie*, 59: 1-73.

Agriculture and Agri-Food Canada. 2011. Algae Identification lab guide. *Agriculture and Agri-Food Canada, Agri-Environment Services Branch*. Canada, 48 p.

Baker, P. 1991. Identification of Common Noxious Cyanobacteria: Part 1 Nostocales. *Urban Water Research Association of Australia. Research Report No. 29.*

Baker, P. 1992. Identification of Common Noxious Cyanobacteria: Part 2 Chroococcales, Oscillatoriales. *Urban Water Research Association of Australia. Research Report No*. 46.

Baker, P.D., & Fabbro, L.D. 2002. A guide to the Identification of common Blue-Freen Algae (Cyanoprocaryota) in Australian Freshwaters. *Canberra (Australia): Cooperative Research Center for Freshwater Ecology, Identification Guide No. 25*.

Dillard, G.E. 2008. *Common Freshwater Algae of the United States; An Illustrated Key to the Genera (Excluding the Diatoms), 2. edition*. Schweizerbart Publishers.

Etheredge, M.K., & Pridmore, R.D. 1987. The Freshwater Planktonic Blue-Greens (Cyanophyta/Cyanobacteria) of New Zealand: A Taxonomic Guide. *Wellington (NZ): Water & Soil Misc. Publication No. 3.*

Entwisle, T.J., Sonneman, J.A., & Lewis, S.H. 1997. *Freshwater Algae in Australia*. NSW (Australia): Sainty and Associates Pty Ltd.

Graham, J.E., Wilcox, L.W., & Graham, L.E. 2008. *Algae (2nd Edition)*. Benjamin Cummings.

Hindák, F. 2008. *Colour atlas of Cyanophytes*. Veda, Bratislava: Publishing House of the Slovak Academy of Sciences.

Jansen van Vuuren, S., Taylor, J., Gerber, A. & van Ginkel, C. 2006. *Easy identification of the most common freshwater algae. A guide for the identification of microscopic algae in South African freshwaters.* Pretoria (ZA): North West University.

John, D.M., Whitton, B.A., & Brook, A.J. 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. Cambridge (UK): Cambridge University Press.

Joosten, A.M.T. (2006) *Flora of the blue-green algae of the Netherlands. I. The non-filamentous species of inland waters*. Utrecht (Nertherlands): KNNV Publishing.

Komárek, J. 2001. Review of the cyanoprokaryotic genus *Romeria*. *Czech Phycology*, **1**: 5-19.

Komárek, J. & Anagnostidis, K. 1989 Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4-Nostocales. *Archiv für Hydrobiologie*, 56: 247-345.

Komárek, J., & Komárková, J. 2002. Review of the European *Microcystis* morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Czech Phycology,* **2**: 1-24.

Komárek, J., & Komárková, J. 2004. Taxonomic review of the cyanoprokaryotic genera *Planktothrix* and *Planktothricoides*. *Czech Phycology*, **4:** 1-18.

Komárek, J., & Komárková K. 2006. Diversity of *Aphanizomenon*-like cyanobacteria. *Czech Phycology,* 6: 1-32.

Komárek, J. & Zapomělová, E. 2007. Planctic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena*=subg. *Dolichospermum – 1. Part: coiled types*. Fottea Olomouc, 7: 1-31.

Komárek, J. & Zapomělová, E. 2008. Planctic morphospecies of the cyanobacterial genus Anabaena=subg. Dolichospermum – 2. Part: straight types. Fottea Olomouc, 8:1-14.

McGregor, G.B. 1966. *Freshwater Cyanoprokaryota of North-Eastern Australia. 1: Oscillatoriales*. Flora of Australia, Supplementary Series 24.

McGregor, G.B., & Fabbro, L.D. 2001. A guide to the Identification of Australian Freshwater Planktonic Choococcales (Cyanoprokaryota/Cyanobacteria). *Canberra (Australia): Cooperative Research Center for Freshwater Ecology, Identification Guide No. 39*.

McGregor, G.B., & Glenn B. 2006. Freshwater Cyanoprokaryota of North-Eastern Australia 1-Oscillatoriales. *Australian Biological Resources Study, flora of Australia Supplementary Series,* 24.

Prescott, G.W. 1962. *Algae of the western Great Lakes area, with an illustrated key to the genera of desmids and freshwater diatoms*. Dubuque (USA): W. C. Brown Co. Publishers.

Prescott, G.W.1978. *How to know the Freshwater Algae*. Dubuque (USA): W.C. Brown Co. Publishers.

Taft, C.E., & Taft, C.W. 1990. *The Algae of Western Lake Erie, 1971 reprint.* Columbus (USA): College of Biological Sciences, the Ohio State University in cooperation with Ohio Sea Grant College Program.

Wehr J. D., & Sheath R. G. 2002. *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification.* San Diego (USA): Academic Press.

Whitford, L.A., & Schumacher, G.J. 1984. *A Manual of Fresh-Water Algae*. Sparks Press.

York, P.V., Johson L.R., & Whitton, B.A. 2002. *A Key for the Identification of Blue-Green Algae of the British Isles*. CD ROM. Cambridge (UK): Cambridge University Press.

Références francophones

Bourrelly, P. 1985. Les algues d'eau douce: Initiation à la systématique. III. Les algues bleues et rouges, les Eugléniens, Péridiniens et Cryptomonadines. Paris (France) : Société Nouvelle des Éditions Boubée.

Compère, P. 1986. Flore pratique des algues d’eau douce de Belgique : t.1 Cyanophyceae. Meise (Belgique) : Jardin Botanique National de Belgique.

Gomont M. 1894. Monographie des Oscillatoriées. Paris (France): Museum National d’Histoire Naturelle.

Leitao M., & Couté A. 2005. Guide pratique des cyanobactéries du grand Ouest de la France. Agence de l’eau Seine-Normandie.

Références en autres langues

Cirés Gómez S., & Quesada de Corral, A. 2011. *Catálogo de cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas de las aguas continentales españolas*. Ministerio del Medio Ambiente y Medio Rural y Marina.

Geitler L. 1932. *Cyanophyceae von Europa (Blaualgen)*. Rabenhorst Kryptogamen Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz.

Komárek, J., & Anagnostidis, K. 1998. Cyanoprokaryota. 1. Teil. Chroococcales. In: Ettel, H.,. Gärtner G., Heynig H., & Mollenhauer D. (Eds). *Süßwasserflora von Mitteleuropa.* Stuttgart-Jena, 548 p.

Komárek, J., & Anagnostidis K. 2005. Cyanoprokaryota. 2. Teil. Oscillatoriales. In: Ettel, H.,. Gärtner G., Heynig H., & Mollenhauer D. (Eds). *Süßwasserflora von Mitteleuropa.* Stuttgart-Jena, 759 p.

Pliński, M., & Komárek, J. 2007. *Flora Zatoki Gdańskiej i Wód przyległych (Bałtyk Południowy) Sinice – Cyanobakterie (Cyanoprokaryota).* Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk.

Annexe 7.a - Récapitulatif des réponses obtenues concernant l'analyse des cyanobactéries utilisés par les laboratoires à travers le monde

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Délai d' analyse	Conservation	Méthode	Grossissement	Niveau de Taxonomie	Épifluorescence en complément	Comptage de picocyanobactéries	Nombre de champs analysés	Choix des champs (hasard/transect)	Expression des résultats	Calcul de Biovolume	Temps d'analyse pour un échantillon
Afrique du Sud	1	G*	< 48h	1% Lugol (1 ml dans 100 ml)	Utermöhl	*400	Genre	non	oui	60	hasard	Cellules.mL^{-1}	non	5 min
Australie	4	G	1-72h	1 ml de Lugol par 100 ml dans bouteilles PET	Chambre de Sedgewick-Rafter	*100, *200, *400	Genre	non	non	200 ou jusqu'à 23 unités d'une même espèce cible comptées	transects	Cellules.mL^{-1}	non	30 min
Australie	5	G	< 24h	Lugol	Utermöhl	*200, *400	Genre, parfois espèce si possible	oui	non	20, 40 ou 60	transects	Cellules.mL^{-1}	non	1 h
Australie	6	G	1-24h	Lugol	Utermöhl + les échantillons avec des colonies de Microcystis ou Woronichinia sont d'abord traités avec KOH	*200, *600	Genre et espèce si possible	non	oui	dépendant des espèces de cyanobactéries. 5 à 30 champs à *600 et 20 champs à toutes la chambre à *200.	selon les sections opposées du cercle de la chambre de sédimentation	Cellules.mL^{-1}	oui, utilisation de tailles de cellules standards de l'Australie du Sud-Est pour chaque espèce	0.3-1 h

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Délai d' analyse	Conservation	Méthode	Grossissement	Niveau de Taxonomie	Épifluorescence en complément	Comptage de picocyanobactéries	Nombre de champs analysés	Choix des champs (hasard/transect)	Expression des résultats	Calcul de Biovolume	Temps d'analyse pour un échantillon
Australie	7	G	48h-1 sem.	Lugol acide (0.25% pour 200 ml) dans bouteilles en plastique.	Sedgewick Rafter chambers	*100, *400	Genre et espèce pour les cyanobactéries potentiellement toxiques	non	oui	40 champs à *400 (jusqu'à 100 unités de chaque espèce)	transects	Cellules.mL^{-1}	oui	30 min
Australie	9	**?**	24h - 30j	1mL de Lugol par 100 ml	Sedgewick Rafter chambers**Méthode**	*100, *200, *400, *1000	Genre et espèce si possible	oui	oui	Un minimum de 3 à 5 champs ou 3 transects	les deux	Cellules.mL^{-1}	oui	30-60 min
Autriche	10	?	qq jours-qq mois	Lugol dans bouteilles en verre	Utermöhl	*100, *400	Genre	non	oui	minimum 160 champs	hasard	Filaments.mL^{-1} et Cellules.mL^{-1} pour les coloniales	oui, calcul selon Wetzel & Likens (2000)	2-3 h
Brésil	11	R**	Analyse de diversité: qq heures; Dénombre-ment: qq j.-qq mois	Lugol-acétique: 10 gouttes dans 100 ml dans une bouteille brune	Utermöhl	*400	Espèce	non	non	au moins 10 ou jusqu'à 400 individus au total	hasard	Cellules.mL^{-1}	oui, calcul selon Hillebrand et al. (1999)	5 h
Canada	14	G	qq heures - qq mois	Lugol 5% dans bouteille en verre de 125 ml	Utermöhl	*400	Genre	non	non	Variable	hasard	Cellules.mL^{-1}	non	45 min

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Délai d' analyse	Conservation	Méthode	Grossissement	Niveau de Taxonomie	Épifluorescence en complément	Comptage de picocyanobactéries	Nombre de champs analysés	Choix des champs (hasard/transect)	Expression des résultats	Calcul de Biovolume	Temps d'analyse pour un échantillon
Canada	15	R	qq sem.- qq mois	Lugol acide 4%	Utermöhl	*400, *1600	Genre	non	non	20-50	transects	Cellules.mL^{-1}	oui, calcul selon Hillebrand et al. (1999), Vadrucci et al. (2007) et Olenina et al. (2006)	1 jour
Espagne	21	R	24 h – qq sem.	Toxines: congélation rapide / morphologie et biovolume: 4% de formaldéhyde / dénomb. Lugol	Utermöhl	*100, *400, *630, *1000	Espèce	oui	non	jusqu'à 400 cellules	hasard	Cellules.mL^{-1}	oui	1-2 h à 1 jour. Dépend de la complexité
Estonie	22	**?**	2 – 3 semaines	Lugol acide dans bouteilles en plastique	Utermöhl	*400	n.c.	non	non	90 champs	les deux	Cellules.mL^{-1}; filament.mL^{-1} et colonies.mL^{-1}	n.c.	2-3 h
Finlande	25	G et R	1 jour - expertise à 6 mois - recherche	Lugol acide (0,5 mL pour 100 mL) dans bouteilles en verre au noir et à 4°C	Utermöhl	*100, *200, *400	n.c.	non	non	chambre entière à *100 et *200 puis 50 à 100 champ à *400	les deux	Cellules.mL^{-1}	n.c.	1-3 h

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Délai d' analyse	Conservation	Méthode	Grossissement	Niveau de Taxonomie	Épifluorescence en complément	Comptage de picocyanobactéries	Nombre de champs analysés	Choix des champs (hasard/transect)	Expression des résultats	Calcul de Biovolume	Temps d'analyse pour un échantillon
France	27	G	24-48h	Pas de conservateur à 4°C	Microscope droit et sédimentation	*100, *400, *1000	Espèce	oui	non	variable	transects	Cellules.mL^{-1}	non	1 h
France	28	G et R	< 48h pour gestion et 15 j.-3 ans pour recherche	Lugol et formol 10%	Utermöhl	*100, *400, *1000	Genre et espèce si possible	oui	non	< 100	hasard	Cellules.mL^{-1}	oui, calcul selon Sun & Li (2003)	0,5-2,5 j
France	30	R	<1 sem.	Azote liquide le temps de prélèvement puis -80°C	Utermöhl	*400, *1000	Espèce	non	oui	variables cf. protocole	transects	les deux	oui	2 h
France	31	R	1 sem-1 mois	Formol (5%) neutralisé au borax +Lugol et conservé à l'abri de la lumière	Utermöhl	*100, *400	Espèce	non	non	3	hasard	nombre de filaments et Cellules.mL^{-1} pour les coloniales	non	2-4 h
France	32	G	24-96h	Lugol (0.5% final)	Microscope droit avec cellule de Nageotte	*100, *200, *400	Genre	non	non	1 à 40 bandes	n.c.**	les deux	non	1.5 h
France	33	G	24-48h	Réfrigération seule si < 48h, formol si > 48h	Utermöhl	*100, *400	Genre	non	oui par cyto-métrie	5 champs après balayage de la lame	hasard	nombre de filaments et Cellules.mL^{-1} pour les coloniales	non	1-2 h

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Délai d' analyse	Conservation	Méthode	Grossissement	Niveau de Taxonomie	Épifluorescence en complément	Comptage de picocyanobactéries	Nombre de champs analysés	Choix des champs (hasard/transect)	Expression des résultats	Calcul de Biovolume	Temps d'analyse pour un échantillon
France	34	G	24-48h	Échantillons frais sans conservateur, gardés à 4°C au noir	Microscope droit avec cellule de Nageotte	*100, *400	Genre et espèce si possible	non	oui	n.c.**	transects	Cellules.mL^{-1}	non	30 min
France	37	?	< 24 h	Conservation entre 2 et 8°C	Microscope droit avec cellule de Nageotte	n.c.	n.c.	non	non	40 bandes	transects	Cellules.mL^{-1}	n.c.	45 min
France	38	G	24-36h	Lugol couleur thé clair dans un flacon en poypropylène	Utermöhl + microscope droit avec hémacimè-tre lorsque coloniales trop importantes	*100, *200, *400	Genre	oui	oui	n.c.	les deux	Cellules.mL^{-1}	oui, méthode PEG	30 min
France	39	G	24-36h	Dans flacon en polypropylène avec une solution de Lugol couleur thé	Utermöhl + microscope droit avec cellule de Malassez lorsque densité très importante	*100, *200, *400	Genre	oui	oui	n.c.	les deux	Cellules.mL^{-1}	oui, méthode PEG	30 min
France	40	G	24h-48h	Lugol, coloration thé clair	Utermöhl + autre méthode de microscopie directe non détaillée	*50,* 100,* 400,* 1000	Genre et espèce si possible	non	parfois	variable, jusqu'à 50	transects	les deux	Parfois	5 min à qq heures

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Délai d' analyse	Conservation	Méthode	Grossissement	Niveau de Taxonomie	Épifluorescence en complément	Comptage de picocyanobactéries	Nombre de champs analysés	Choix des champs (hasard/transect)	Expression des résultats	Calcul de Biovolume	Temps d'analyse pour un échantillon
France	41	?	24h-48h	3 mL de Lugol dans 300 mL ou 10 mL de Formol dans 300 mL	Utermöhl + Microscope droit après traitement spécial si cyanobacté-ries flottantes	n.c.	n.c.	non	non	n.c.	n.c.	Cellules.mL^{-1}	n.c.	quelques minutes à quelques heures
Grèce	42	G	< 24h	1 ml de Lugol dans 100 ml, bouteilles en verre brunes/1L d'échantillon brut dans bouteille en verre pour toxines	Utermöhl	*100	Genre	non	non	5	hasard	Cellules.mL^{-1} pour les coloniales et filaments pour les autres	non	20 min
Hongrie	46	?	< 24h	Contenant en verre conservé à 4-6°C - Pas de conservateur	Microscope droit après filtration sur membrane (pores : 8 µm) et centrifu-gation	n.c.	n.c.	oui	non	> 400 individus	les deux	Cellules.mL^{-1}	n.c.	1 h 30
Inde	47	?	< 24h	Lyophilisation dans vials de cryogènisation	Microscope droit après centrifu-gation	*400	Genre	non	non	> 4	hasard	filaments et colonies	oui	28 h
Israel	48	?	1 jour-1 sem.	Lugol	Utermöhl	*100, *400	Espèce	oui	non	45	hasard	Cellules.mL^{-1} et filaments.mL^{-1}	oui, calcul selon Hillebrand et al. (1999)	2-5 h

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Délai d' analyse	Conservation	Méthode	Grossissement	Niveau de Taxonomie	Épifluorescence en complément	Comptage de picocyanobactéries	Nombre de champs analysés	Choix des champs (hasard/transect)	Expression des résultats	Calcul de Biovolume	Temps d'analyse pour un échantillon
Italie	49	R	< 1 an	1ml de Lugol pour 100ml, bouteilles en verre, au noir à 4°C	Utermöhl	*100, *400	Espèce	non	non	espèces les plus abondantes: 30 champs à *400	les deux	Cellules.mL^{-1}	oui, calcul selon Hillebrand et al. (1999)	1,5-2,5 h (tout le phyto-plancton)
Lituanie	51	R	2 sem.-6 mois	1.5 ml de Lugol dans 100 ml dans bouteilles en verre.	Utermöhl	*400	Genre et espèce si possible	non	non	1 ou 2 transects	transects	nombre de filaments et Cellules.mL^{-1} pour les coloniales	oui, calcul selon Olenina et al. (2006)	2-4 h
Luxembourg	52	R	< 2 sem.	Lugol	Utermöhl	*400	Espèce	non	non	10	hasard	les deux	non	30 min-1 h
Macédoine	53	R	< 7 jours	4% de formaldéhyde dans bouteilles en plastique de 120 ml	Utermöhl	*400, *1000	Espèce	oui	non	50	transects	filaments et colonies	non	4-5 h
Namibie	54	G	< 24h	pas de conservateurs	Microscope droit et dénombre-ment sur membrane après filtration	*500	Espèce	non	oui	10	hasard	Cellules.mL^{-1}	non	30-45 min
Norvège	55	R	qq sem.-6 mois	Lugol dans bouteilles brunes en verre	Utermöhl	*400, *630, *1000	Espèce	non	parfois	n.c.	transects	Cellules.mL^{-1}	oui	3-4 h

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Délai d' analyse	Conservation	Méthode	Grossissement	Niveau de Taxonomie	Épifluorescence en complément	Comptage de picocyanobactéries	Nombre de champs analysés	Choix des champs (hasard/transect)	Expression des résultats	Calcul de Biovolume	Temps d'analyse pour un échantillon
Nouvelle-Zélande	56	G	ASAP-5 j.	4 gouttes de Lugol /100 ml après échantillon-nage, bouteille plastique ou verre	Utermöhl	*100, *200. *400, *1000	Espèce	non	oui	environ 311 (la moité d'une chambre à grossisse-ment 200*)	les deux	les deux (déterminé par le client)	oui	2 h
Nouvelle-Zélande	57	G	0-5 j.	Lugol	Utermöhl	*400	Genre	non	non	30	hasard	Cellules.mL^{-1}	oui	20 min
Nouvelle-Zélande	58	R	1 sem. Pour iden., qq mois pour énum.	Lugol	Utermöhl	*100, *400	Genre et espèce si possible	non	n.c.	10	hasard	les deux	n.c.	30 min
Pays-Bas	60	G et R	1j-qq sem. (routine < 1 sem.)	1 ml de Lugol acide par 250 mL mais dépend de l'échantillon. Couleur thé clair. Bouteilles HDPE	Microscopie inversée et cellules de Lund	*200	Genre pour gestion et espèce pour recher-che	non	oui	460	transects	les deux si demandé	oui	25-30 min

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Délai d' analyse	Conservation	Méthode	Grossissement	Niveau de Taxonomie	Épifluorescence en complément	Comptage de picocyanobactéries	Nombre de champs analysés	Choix des champs (hasard/transect)	Expression des résultats	Calcul de Biovolume	Temps d'analyse pour un échantillon
Pays-Bas	61	R	< 24h	Lugol 1%	Utermöhl	*100, *1000	Genre	oui	non	100-400	transects	Cellules.mL^{-1}	oui	n.c.
Pologne	63	R	qq j.-8 mois	Lugol couleur thé clai, bouteille plastique. Addition de 1% de formaldéhyde (initial 20%) si stockage long. Picocyanobac-téries: 1% de formol tamponné (initial 20%)	Utermöhl	*100, *400, *1000	Genre	Filtre de polycar-bonate noir pour les picocya nobacté ries.	oui	pour picocyanoba ctéries: entre 20 et 50 (jusqu'à 400 cellules), pour les plus grosses: 20 champs pour les taxons communs, et toute la chambre pour les taxons rares	hasard	Cellules.mL^{-1}	oui	2-5 h
Pologne	64	R	4-8 mois	2% de Lugol, bouteille en verre de 1L jusqu'à sédimentation des cellules puis transfert dans bouteille en téflon de 10 ml	Microscope droit avec hématimètr e Fusch–Rosenthal	*400	Espèce	non	non	100	transects	filaments et colonies	non	30 min

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Délai d' analyse	Conservation	Méthode	Grossissement	Niveau de Taxonomie	Épifluorescence en complément	Comptage de picocyanobactéries	Nombre de champs analysés	Choix des champs (hasard/transect)	Expression des résultats	Calcul de Biovolume	Temps d'analyse pour un échantillon
Pologne	65	?	2 jours - 3 mois	Lugol (1%), bouteilles en verre ou en plastique dans le noir et au frais	Utermöhl	n.c.	n.c.	non	oui	50 champs à la chambre entière en fonction de l'échantillon	les deux	les deux	n.c.	n.c.
Portugal	66	?	2-10 jours	0,5% de Lugol dans bouteille en plastique de 100 mL	Utermöhl	n.c.	n.c.	non	oui	au moins 2	transects	Cellules.mL^{-1}	n.c.	2 h
République Tchèque	67	?	48 h	Lugol	Microscope convention-nel et chambre de comptage Buerker	n.c.	n.c.	non	non	minimum de 5 champs (dilution des échantillons pour atteindre 100 à 300 comptes par observation)	les deux	Cellules.mL^{-1}		15 - 20 min
Slovaquie	69	G	< 20h	n.c.	Microscope conventionnel avec chambre de comptage de type CYRUS	*200, *400, *1000	Espèce	oui	non	40-169 carrés de chambre CYRUS	transects	les deux pour filamenteuses et Cellules.mL^{-1} pour les coloniales	oui	2 h

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Délai d' analyse	Conservation	Méthode	Grossissement	Niveau de Taxonomie	Épifluorescence en complément	Comptage de picocyanobactéries	Nombre de champs analysés	Choix des champs (hasard/transect)	Expression des résultats	Calcul de Biovolume	Temps d'analyse pour un échantillon
Slovénie	70	?	24 - 48 h	Contenants en plastique (100 ou 500 mL), formol (1%) ou Lugol (1%).	Utermöhl et/ou Microscope droit	n.c.	n.c.	non	oui	Entre 5 et 40	hasard	Cellules.mL^{-1}	n.c.	qq minutes à qq semaines
Sri Lanka	71	?	24 h	Bouteilles brunes en verre, Lugol (1%)	Utermöhl et microscope droit	n.c.	n.c.	non	non	100	transects	Filaments.mL^{-1} et colonies.mL^{-1}	n.c.	n.c.
Suisse	73	R	6 mois	n.c.	PCR quantitative pour *Planktothrix Rubescens* + Microscope droit avec filtration sur filtre Whatman	*100	Espèce	oui	non	80	transects	Filaments.mL^{-1}	oui	20 min pour microscopie et 6 min par échantillon
Suisse	74	**?**	> 7 jours	Lugol : 10 gouttes pour environ 200 mL , bouteille en verre	Utermöhl	n.c.	n.c.	non	non	*160: champ ($1cm^2$); *200 (5 transects), * 400 (1 transect)	les deux	Filaments.mL^{-1} et colonies.mL^{-1}	n.c.	2 h 30
Uruguay	78	G	1-7 j.	Lugol dans bouteille en plastique (250-500mL)	Utermöhl	*200, *400	Espèce	non	non	au moins 10 lors d'une efflorescenc e, au moins 30 en conditions normales	transects	Cellules.mL^{-1}	oui	au moins 1 jour pour la sédimentati on, 30-60 min pour le dénombre-ment

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Délai d' analyse	Conservation	Méthode	Grossissement	Niveau de Taxonomie	Épifluorescence en complément	Comptage de picocyanobactéries	Nombre de champs analysés	Choix des champs (hasard/transect)	Expression des résultats	Calcul de Biovolume	Temps d'analyse pour un échantillon
USA	82	?	2-3 sem.	Lugol (0,05 - 1,0% en fonction de la densité de l'échantillon) ou Glutaraldéhyde (0,25 - 0,50% en fonction de l'échantillon)	Utermöhl	n.c.	n.c.	oui	oui	10 à 50 champs à *200 et *400 ainsi qu'un scan complet de la plaque à *100.	transects	Cellules.mL^{-1}	n.c.	1 - 6 h
USA	83	**?**	48 h	Aucun ajout de conservateur	Microscope droit après centrifu-gation - Cytométrie en flux (méthode avancée pour identific-ation morpholo-gique et détection quantitative rapide = gain de temps)	n.c.	n.c.	non	non	Observation de 1 mL d'échantillon	transects	Filaments.mL^{-1} et colonies.mL^{-1}	n.c.	1 h

Pays	Code Laboratoire	Objectifs	Délai d' analyse	Conservation	Méthode	Grossissement	Niveau de Taxonomie	Épifluorescence en complément	Comptage de picocyanobactéries	Nombre de champs analysés	Choix des champs (hasard/transect)	Expression des résultats	Calcul de Biovolume	Temps d'analyse pour un échantillon
USA	86	G	1 j.-qq j.	1% Lugol (1 ml dans 100 ml)	Utermöhl	*400, *1000	Genre et espèce si possible	non	non	jusqu'à 400 cellules	hasard	les deux	oui	30 min -qq h.
USA	89	?	n.c.	Conservation dans des tubes de puis ajout de Lugol (0,1 mL)	Utermöhl et microscope droit			non	non	> 5	hasard	Cellules.mL^{-1}, filaments.mL^{-1}, colonies.mL^{-1}		10 min
USA	97	G et R	Expertise: < 2-3 j Recherche : 1sem.-3 mois	Dénombre-ment: glutaraldéhyde (1 ml pour 100 ml) dans bouteilles en plastique et eau brut congelée pour les toxines	Utermöhl	*400, *630	Genre et espèce	oui	non	maximum 100 champs, jusqu'à 300 unités d'une même espèce	hasard	les deux	oui	1,5-2 h + 1-2 h si le biovolume est demandé
USA	98	G	< 24h	2 échantillons: un avec Lugol et l'autre brut transporté au froid pour tests ELISA	Utermöhl	*400	Espèce	non	oui	10	hasard	Cellules.mL^{-1}	non	1-2 h

**G : Gestion ; ** R : Recherche ; ***n.c. : non communiqué*

Annexe 7.b - Récapitulatif des réponses obtenues concernant les modes de contrôle assurance qualité utilisés par les laboratoires à travers le monde

Pays	Organisme	Assurance Contrôle Qualité
Afrique du Sud	1	Accréditation SANAS (affiliation ILAC) + solutions certifiées + essais interlaboratoires PTS 4 fois par an sauf Microcystines une seule fois + 5% des échantillons en duplicats
Argentine	3	n.c.
Australie	4	n.c.
Australie	5	Échantillons test analysés pour BGA à l'interne une fois par mois + tests d'évaluations de compétences nationaux
Australie	6	Accréditation NEN-EN-ISO/IEC 17025:2005 par le Dutch Council for Accreditation (RvA)+ tests de compétence interlaboratoires
Australie	7	Utilisation de standards certifiés
Australie	9	n.c.
Autriche	10	n.c.
Brésil	11	Utilisation de standards certifiés (de NRC) pour cyanotoxines + nouvelle courbe de calibration pour chaque série d'analyse
Canada	14	n.c.
Canada	15	Échantillons envoyés à Environnement Canada pour l'identification des espèces dominantes
Espagne	21	Calibration interlaboratoire, utilisation de standards et d'échantillons artificiellement enrichis
Estonie	22	n.c.
Finlande	25	n.c.
France	27	Accréditation COFRAC + essais interlaboratoires (circuit AGLAE)
France	28	Comparaisons interlaboratoires au niveau national + utilisation de standards référencés
France	30	Aucun
France	31	n.c.
France	32	n.c.
France	33	Essais interlaboratoires +solutions étalons certifiées

Pays	Organisme	Assurance Contrôle Qualité
France	34	n.c.
France	37	n.c.
France	38	n.c.
France	39	n.c.
France	40	n.c.
France	41	Vérification des résultats par un second technicien sur un certain nombre d'échantillons, réalisation d'une banque de données photographiques qui peut servir de référence, participation à des essais interlaboratoires (Equat) - Organisme formateur
Grèce	42	Utilisation de contrôles certifiés
Hongrie	46	Analyse d'un même échantillon par deux opérateurs différents
Inde	47	Aucun
Israel	48	Essais interlaboratoires
Italie	49	Tests d'évaluations de compétences EQAT
Lituanie	51	n.c.
Luxembourg	52	n.c.
Macédoine	53	n.c.
Namibie	54	n.c.
Norvège	55	n.c.
Nouvelle-Zélande	56	Accréditation IANZ + analyse de réplicats
Nouvelle-Zélande	57	Utilisation de standards certifiés
Nouvelle-Zélande	58	Certification de laboratoire
Pays-Bas	60	Accréditation ISO 17025 + participation à des tests d'évaluation de compétences
Pays-Bas	61	n.c.
Pologne	63	Essais interlaboratoires avec University of Poznan et Gdansk et Department of Plants Systematics and Geography à University of Warsaw

Pays	Organisme	Assurance Contrôle Qualité
Pologne	64	n.c.
Pologne	65	n.c.
Portugal	66	n.c.
République Tchèque	67	Participation à des essais inter-laboratoires organisés par Czech Public Health Institute - Laboratoire de référence en République Tchèque
Slovaquie	69	Certification de laboratoire 1 fois par an + analyses interlaboratoires tous les 4 ans + utilisation de solutions certifiées à chaque fois.
Slovénie	70	Certification
Sri Lanka	71	Préparation d'un manuel regroupant des photographies de cyanobactéries identifiées au Sri Lanka
Suisse	73	Réplicats
Suisse	74	Analyse d'un même échantillon par deux opérateurs différents et participation à des essais interlaboratoires tous les 2 ans
Uruguay	78	n.c.
USA	82	n.c.
USA	83	n.c.
USA	86	n.c.
USA	89	n.c.
USA	97	n.c.
USA	98	Protocol QA/QC standard : analyse de réplicats

**n.c. : non communiqué*